

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS

TESIS DOCTORAL



PREVENCION DE SIGNOS DE TOLERANCIA Y ABSTINENCIA  
OPIOIDE POR CLONIDINA, NIMODIPINO Y DILTIAZEM.

Directora: Dra. M. Isabel Martín Fontelles  
Profesora Titular

FERNANDO LOPEZ REDONDO

MADRID 1991.



*A mis padres  
y hermano*

## AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de una u otra forma me ayudaron durante la realización de la presente Tesis Doctoral. Por los medios que me ofrecieron, por sus consejos y por su interés.

Especialmente a todo el personal del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, quienes depositaron su confianza en mí y me brindaron la oportunidad de continuar avanzando en el mundo de la investigación.

De una forma muy especial, a la Dra. M<sup>a</sup> Isabel Martín, que ha sabido dirigir este trabajo con un entrañable entusiasmo y eficacia, ofreciéndome en todo momento su tiempo, comprensión y apoyo.

También, al Dr. Pedro Lorenzo, Director del Departamento de Farmacología que desde el principio me facilitó todos los medios disponibles para la realización de esta Tesis.

Al Departamento de Biología Animal II (Fisiología Animal) por su tutoría y por permitirme presentar esta Tesis.

Gracias a los que convivieron conmigo todo este tiempo y tuvieron que soportarme: M<sup>a</sup> Isabel Colado, M<sup>a</sup> José Alfaro, Victor del Val y Carlos Goicoechea, todos ellos buenos compañeros de laboratorio.

Tampoco puedo olvidar a mis colegas del Departamento de Biología Vegetal II de la Facultad de Farmacia, donde aprendí a realizar un trabajo científico y donde me inicié en el intrigante mundo de la investigación, ya que siempre se preocuparon por mí.

No debemos olvidarnos de aquellos laboratorios que generosamente nos ofrecieron los fármacos que hemos empleado: Química Farmacéutica Bayer, Laboratorios Boehringer-Ingelheim y Laboratorios Dr. Esteve.

El presente trabajo ha sido subvencionado parcialmente por el Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social. Y ha contado con una Beca Predoctoral de la Universidad Complutense y una ayuda de la Caja de Madrid.

## INDICE

1. INTRODUCCION .....	1
1.1 OPIACEOS .....	2
- Aspectos históricos de los opiáceos .....	2
- Receptores opioides .....	3
- Acciones farmacológicas de los opiáceos .....	6
- Teoría del receptor .....	11
- Mecanismos de los cambios de sensibilidad celular .....	12
- Medida de la tolerancia y la dependencia opioide .....	17
- Mecanismos celulares de la tolerancia y la dependencia .....	19
- Sistema nervioso periférico.Ileon. Conducto deferente .....	24
- Sistema nervioso central .....	35
- Alteraciones en los sistemas de neurotransmisores .....	40
1.2. CALCIO .....	45
- El calcio como un modulador de la función celular .....	45
- Canales de calcio .....	50
- Fármacos antagonistas de calcio .....	55
- Relación de los antagonistas de calcio con los adrenoceptores .....	65
1.3. CALCIO Y OPIACEOS .....	65
- Calcio y acciones agudas de los opiáceos .....	65
- Relación entre tolerancia, dependencia y calcio .....	67
- Estudios subcelulares .....	68
- Adaptación a la pérdida subcelular de calcio .....	70
- Implicaciones funcionales de la alteración del metabolismo del calcio .....	70
2. OBJETIVOS .....	73
3. MATERIAL Y METODOS .....	75
3.1. ESTUDIOS EN ILEON DE COBAYO .....	76
3.1.1. Aislamiento y montaje de la preparación fibra longitudinal plexo mientérico de ileon de cobayo (FL-PM) .....	76
3.1.2. Inducción de tolerancia a la morfina .....	80
3.1.3. Valoración de la tolerancia .....	80
3.1.4. Efecto de la clonidina, el nimodipino y el diltiazem sobre la contracción de la preparación FL-PM .....	81
3.1.5. Modificación de la tolerancia en la preparación FL-PM por los distintos tratamientos .....	81
3.1.6. Valoración de la dependencia a la morfina .....	82
3.1.6.1. Por administración de naloxona <i>in vitro</i> .....	82

3.1.6.2. Por retirada del depósito de morfina <i>in vivo</i> .....	83
3.1.7. Efecto de la clonidina, el nimodipino y el diltiazem sobre la abstinencia a la morfina .....	84
3.1.7.1. Administración <i>in vitro</i> .....	84
3.1.7.2. Tratamientos <i>in vivo</i> .....	84
3.2. VALORACION DE LOS SIGNOS DE ABSTINENCIA A LA MORFINA EN RATA .....	85
3.3. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE MONOAMINAS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA .....	87
3.3.1. Aislamiento de las estructuras del SNC .....	88
3.3.2. Extracción y análisis de las monoaminas en las distintas estructuras del SNC de rata .....	88
3.4. FARMACOS Y REACTIVOS EMPLEADOS .....	91
3.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS .....	92
4. RESULTADOS .....	94
4.1. ESTUDIOS EN ILEON DE COBAYO .....	95
4.1.1. Desarrollo de tolerancia en la preparación FL-PM .....	95
4.1.2. Efecto de la clonidina, el nimodipino y el diltiazem sobre la preparación FL-PM estimulada eléctricamente .....	97
4.1.3. Modificación de la tolerancia por los distintos tratamientos .....	103
4.1.3.1. Modificación de la tolerancia a la morfina por la clonidina .....	103
4.1.3.2. Modificación de la tolerancia a la morfina por el nimodipino .....	104
4.1.3.3. Modificación de la tolerancia a la morfina por el diltiazem .....	106
4.1.4. Estudio de la abstinencia inducida por naloxona .....	111
4.1.4.1. Tratamientos <i>in vitro</i> .....	111
4.1.4.1.1. Efecto de la clonidina sobre la dependencia a la morfina .....	113
4.1.4.1.2. Efecto del nimodipino sobre la dependencia a la morfina .....	115
4.1.4.1.3. Efecto del diltiazem sobre la dependencia a la morfina .....	117
4.1.4.2. Tratamientos <i>in vivo</i> .....	119
4.1.4.2.1. Efecto de la clonidina sobre la dependencia a la morfina .....	119
4.1.4.2.2. Efecto del nimodipino sobre la dependencia a la morfina .....	120
4.1.4.2.3. Efecto del diltiazem sobre la dependencia a la morfina .....	121
4.1.5. Estudio de la abstinencia inducida por retirada del depósito de morfina .....	123
4.2. VALORACION DE LOS SIGNOS DE ABSTINENCIA A LA MORFINA EN LA RATA .....	123

4.3. NIVELES DE MONOAMINAS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL	
DE RATA .....	127
4.3.1. Niveles de 5-hidroxitriptamina y ácido 5-hidroxiindolacético .....	127
4.3.2. Niveles de noradrenalina .....	142
5. DISCUSION .....	147
5.1. De los estudios en íleon .....	148
5.2. De los estudios de comportamiento .....	155
5.3. De los niveles de monoaminas .....	158
6. RESUMEN .....	165
7. CONCLUSIONES .....	169
8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS .....	171

# **1. INTRODUCCION**

## 1.1. OPIACEOS.

### Aspectos históricos.

Históricamente, el médico ha tenido en el opio (jugo de *Papaver somniferum*) una base de actuación a la que recurrir contra el dolor. Aunque los efectos psicológicos del opio ya eran conocidos por los antiguos sumerios, la primera referencia escrita se encuentra en los documentos de Teofrasto en el siglo III a.C.

Los médicos árabes conocían bien las propiedades del opio y fueron los que introdujeron su uso en oriente para combatir la disentería.

Paracelso (1493-1541) popularizó su uso en Europa, donde estaba muy desacreditado debido a su toxicidad, y llegó a denominarlo "piedra de la inmortalidad". Fue el primero que utilizó el opio en forma de tintura (láudano).

Thomas Sydenham, ya en pleno siglo XVII, escribió: "entre los remedios puestos por Dios al servicio de la humanidad, no hay ninguno tan eficaz como el opio para aliviar los sufrimientos de los hombres". Como muestra de esta eclosión y fama del producto, personajes célebres como Armand de Duplessis y el Cardenal Richelieu se encontraban entre sus consumidores habituales.

En el siglo XIX se aislaron los primeros alcaloides del opio. En 1806 Sertürner aisló la morfina (llamada así por Morfeo, dios del sueño); en 1832 Robiquet lo hizo con la codeína y en 1848 Merck con la papaverina. A partir de entonces el uso de los alcaloides puros, en lugar de preparados de opio crudo comenzaron a difundirse por todo el mundo médico.

Con la aparición de la formas de administración parenteral, se originó una nueva y más grave forma de adicción.

El problema de la adicción a opiáceos estimuló la búsqueda de otros analgésicos, que fueran potentes y que carecieran de este efecto adverso. En 1951 Eckenhoff y colaboradores usaron la nalorfina como antídoto del envenenamiento



producido por morfina. En 1953 Wikler y colaboradores demostraron que en adictos, la nalorfina desencadenaba un síndrome de abstinencia; y en 1954 Lasagna y Beecher informaron que la nalorfina tenía acción analgésica, a pesar de que producía ansiedad y disforia, por lo que no era clínicamente útil como analgésico. Esto estimuló aún más los estudios sobre el tema, que condujeron a la aparición de nuevos fármacos, como el antagonista naloxona, o compuestos con acciones mixtas como la pentazocina, el butorfanol o la buprenorfina.

Investigaciones llevadas a cabo por W.R. MARTIN (1967) concluían que las complejas interacciones entre los fármacos tipo morfina y los agonistas/antagonistas mixtos se podían explicar por la existencia de un tipo de receptor para opiáceos y fármacos afines.

Así, en la década de los 70, diferentes grupos de investigadores (PERT y SNYDER, 1973; SIMON, HILLER y EDELMAN, 1973; TERENIUS, 1973) describieron independientemente lugares de unión estereoespecíficos y saturables para opiáceos en mamífero (JAFJE y MARTIN, 1986).

Casi paralelamente, Hughes y Kosterlitz y sus colaboradores aislaron en el encéfalo de cerdo dos pentapéptidos (Leu-encefalina y Met-encefalina) que mostraban acción analoga a la de la morfina en león de cobayo (HUGHES y col., 1975). En el mismo año, Goldstein y colaboradores aislaron a partir de la hipófisis, sustancias de características similares (COX y col., 1975).

Posteriormente se ha comprobado que existen tres familias de péptidos opioides y múltiples tipos de receptores para ellos (JAFJE y MARTIN, 1986).

### Receptores opioides.

Actualmente se considera la existencia de 5 tipos de receptores opioides: *mu* ( $\mu$ ), *delta* ( $\delta$ ), *kappa* ( $\kappa$ ), *sigma* ( $\sigma$ ) y *epsilon* ( $\epsilon$ ) (W.R. MARTIN y col., 1976; WÜSTER y col.,

1979; AKIL y col., 1980). A través de estos receptores realizan sus acciones farmacológicas, tanto los opiáceos (morfina y derivados), como los péptidos opioides endógenos (encefalinas, endorfinas y dinorfinas). Todos ellos tienen como antagonista común, aunque con distintas afinidades, a la naloxona.

Los **receptores  $\mu$**  tienen alta afinidad por la morfina y por otras sustancias análogas a la morfina y a través de ellos producen muchos de los efectos opiáceos clásicos. Se relacionan con la analgesia supraespinal, la depresión respiratoria, la euforia y con la producción de dependencia. Se localizan en núcleos del tálamo y del hipotálamo, sustancia gris periacueductal, núcleos interpedunculares y núcleos del rafe. Tienen una distribución laminar en el córtex cerebral (capas I y IV) que es más densa en el córtex límbico (LEWIS y col., 1983a,b). Su ligando endógeno "prototipo" es la  $\beta$ -endorfina.

Al comprobar que existía tolerancia cruzada en la analgesia entre la morfina y las encefalinas, pero que ésta no existía en los modelos periféricos, se postuló y posteriormente se demostró, la existencia de dos subtipos de receptores  $\mu$ : Los receptores  $\mu_1$ , a los que se une la morfina y las encefalinas con alta afinidad y los  $\mu_2$ , que serían selectivos para la morfina. Los  $\mu_1$  median la analgesia supraespinal, pero no la dependencia producida por la morfina, y los  $\mu_2$  median la depresión respiratoria (PASTERNAK y WOOD, 1986).

El grupo de Kosterlitz (LORD y col., 1977) observó que en tejidos periféricos aparecen diferencias entre la morfina y las encefalinas. Mientras que la morfina es más potente que las encefalinas en el íleon de cobayo, en el conducto deferente de ratón ocurría lo contrario. Luego se vio que no existía tolerancia cruzada entre la morfina y las encefalinas en estas preparaciones (SCHULZ y col., 1982). Así, se postularon los **receptores  $\delta$**  por los que tendrían gran afinidad las encefalinas. Aunque inicialmente descritas en el sistema nervioso periférico, las encefalinas también existen en el sistema nervioso central (en el cuerpo estriado, amígdala, núcleo accumbens, tubérculo olfatorio

y núcleo del puente (GOODMAN y col., 1980). Al contrario que los receptores  $\mu$ , que se distribuyen sobre todo en el sistema límbico de forma laminar (LEWIS y col., 1983a,b), los  $\delta$  tienen una distribución más difusa (capas II, III, V y VI) excepto en el núcleo caudado-putamen (BOWEN, 1981). Se han relacionado con la producción de depresión respiratoria, integración motora, sensación olfatoria y función cognoscitiva (MANSOUR y col., 1988)

En general los efectos mediados fisiológicamente (probablemente: analgesia espinal, liberación de hormona del crecimiento (GH)) por los receptores  $\delta$  son muy difíciles de definir ya que los ligandos hasta ahora disponibles son bastante inespecíficos (reaccionan también con receptores  $\mu$ ) y al ser tan pequeños (cinco aminoácidos), son muy inestables y por tanto inadecuados para la administración sistémica. Actualmente hay ya otros ligandos sintéticos con mayor selectividad ((D-Pen<sup>2</sup>-Pen<sup>5</sup>)-encefalina, (D-Pen<sup>2</sup>-D-Pen<sup>5</sup>)-encefalina (DPDPE), (D-Ser<sup>2</sup>)Leu-encefalina-Thr (DAVID y col., 1982; MOSBERG y col., 1983; AKIYAMA y col., 1985).

Los **receptores  $\kappa$**  están relacionados con la analgesia espinal, ataxia, sedación y miosis. Sobre ellos actúan agonistas del tipo de la etilcetociclazocina. Son, además, muy selectivos para la dinorfina (1-17) que sería su ligando endógeno natural. Es clásica, a la hora de estudiar los receptores  $\kappa$ , la preparación del conducto deferente de conejo, que es una fuente "pura" de ellos (OKA y col., 1982). En el cerebro de cobayo se han visto concentrados en las láminas V y VI del córtex y en el núcleo caudado-putamen (GOODMAN y SNYDER, 1982a,b). En rata, se han encontrado en el núcleo caudado-putamen, núcleo accumbens, amígdala, hipotálamo, eminencia media y núcleo del tracto solitario (MANSOUR y col., 1988).

También se ha postulado la existencia en cobayo de dos tipos de receptores  $\kappa$  a nivel de la médula espinal, los  $\kappa_1$  y los  $\kappa_2$  (ATTALI y col., 1982). Se ha sugerido que la dinorfina es el ligando endógeno natural para los receptores  $\kappa_2$  mientras que el agonista sintético U-69593 es el que se une con alta afinidad a los  $\kappa_1$  (ZUKIN y col.,

1988). El papel de estos subtipos de receptor  $\kappa$  todavía no está aclarado, pues en cerebelo de cobayo se ha encontrado que abunda más un tipo que otro, y su estudio dependerá del desarrollo de ligandos más selectivos (TIBERI y MAGNAN, 1990).

A través de **receptores  $\sigma$** , fármacos como la N-alilnormetazocina (SKF-10047) y la ciclazocina producen efectos estimulantes en el sistema nervioso autónomo y efectos psicotomiméticos. Se localizan en el hipocampo y también periféricamente (ileon de cobayo). Estos receptores, que son los únicos que no antagoniza la naloxona, se han considerado "opioides" con ciertas reservas, debido también a que se pensaba que la fenciclidina (PCP) ejercía sus efectos psicotomiméticos a través de ellos (ZUKIN y ZUKIN, 1979). Recientemente se ha demostrado con radioligandos la existencia de receptores independientes. La PCP se une a un único receptor, mientras que la N-alilnormetazocina presenta dos lugares de unión: uno llamado receptor  $\sigma$  de alta afinidad y otro de baja afinidad, que corresponde al lugar de unión de la PCP (MANALLACK y col., 1986). Queda por dilucidar si los efectos psicotomiméticos de cada clase de fármaco están mediados por el mismo o por distintos receptores.

Los **receptores  $\epsilon$**  fueron caracterizados por la unión de una  $\beta$ -endorfina (1-31) de cadena larga (WÜSTER y col., 1979). Se conoce muy poco de los receptores *epsilon* pero se piensa que median analgesia, ya que un acortamiento del extremo carboxiterminal de la  $\beta$ -endorfina suponía pérdida de capacidad analgésica (HÖLLT, 1986), y porque la potencia de la amidorfina y metorfamida, que también se unen a estos receptores, se correlaciona bien con su actividad analgésica. Su localización es periférica y abundan en el conducto deferente de rata (SCHULZ y col., 1979).

#### Acciones farmacológicas de los opiáceos.

Las acciones farmacológicas que producen los opiáceos están bien estudiadas

y se pueden resumir en sedación, analgesia, depresión respiratoria y cambios en la temperatura. La exposición repetida a los opiáceos produce tolerancia a esas acciones pudiendo darse una respuesta muy reducida o incluso no darse. Hoy se conoce que la unión de los opiáceos a sus receptores activa ciertos mecanismos bioquímicos que se manifiestan por las acciones farmacológicas descritas más arriba y que inician los pasos que llevan al desarrollo de los fenómenos de tolerancia y dependencia. La naturaleza de los procesos bioquímicos que producen la tolerancia no se conoce aún en profundidad aunque hay hipótesis que apuntan a que existe una adaptación celular (AXELROD, 1956; COCHIN y AXELROD, 1959). Dado que los resultados farmacocinéticos no han sido capaces de explicar los fenómenos de tolerancia ni de dependencia física, se ha buscado una aproximación más funcional, que considera que los cambios que subyacen a la tolerancia y la dependencia son adaptaciones de tipo neuroquímico.

Después de una amplia consulta de la literatura sobre opiáceos, podemos decir que existen frecuentes contradicciones e inconsistencias. Así, los mecanismos de adaptación celular que se producen en el desarrollo de la tolerancia pueden depender de cada célula y/o del procedimiento utilizado para inducir la tolerancia. Además, dichos procesos adaptativos pueden ir acompañados de dependencia física, o no, y frecuentemente se aplica el término tolerancia a dos o más fenómenos diferentes. Para evitar confusiones vamos a definir los términos más comunes que se van a emplear en la presente Tesis Doctoral.

Desensibilización: También conocida como taquifilaxia. Representa una pérdida de respuesta rápida, que ocurre entre segundos y minutos (HARDEN, 1983).

La desensibilización puede ser homóloga si la pérdida de respuesta se debe sólo a un tipo de receptor, mientras que puede ser heteróloga si la pérdida de respuesta está debida a alteraciones en varios sistemas de receptores (SU y col., 1976a,b).

Procesos adaptativos: Se dan en forma de hiper- o subsensibilidad y representan fenómenos que se desarrollan más lentamente, pudiendo tardar su establecimiento de días a semanas.

Hipersensibilidad: Término propuesto por FLEMING y col. (1973) que representa un desplazamiento a la izquierda la curva dosis-respuesta para un agonista.

Subsensibilidad: También denominada tolerancia, representa un desplazamiento a la derecha de la curva dosis-respuesta para un agonista y se acompaña generalmente de una disminución de la pendiente o de la respuesta máxima (FLEMING y col., 1973). La tolerancia representa la pérdida en la capacidad de respuesta de un fármaco como consecuencia de su uso continuado y se ha aplicado el término particularmente a las drogas de abuso.

La tolerancia podría ser entendida como la manifestación de diferentes mecanismos de adaptación celular. Muchos de estos procesos adaptativos pueden estar asociados con la dependencia pero otros no. La tolerancia y la dependencia afectan amplias zonas del neuroeje con cambios en varios sistemas de neurotransmisores y complejas interacciones entre circuitos neuronales.

Es posible distinguir tres variedades de tolerancia farmacológica adquirida: disposicional o farmacocinética, farmacodinámica y de conducta. La tolerancia disposicional a los fármacos resulta de cambios en las propiedades farmacocinéticas del agente en el organismo, de tal modo que concentraciones reducidas están presentes en los sitios de acción del fármaco. El mecanismo más común es el aumento del índice metabólico. La tolerancia disposicional tiene relativamente poco efecto sobre la intensidad máxima de acción y no produce generalmente más que una disminución de tres veces en la magnitud de la sensibilidad.

La tolerancia farmacodinámica resulta de cambios adaptativos dentro de los sistemas afectados, en forma tal que la respuesta se reduce en presencia de la misma concentración de fármaco.

La tolerancia de conducta se ha definido como un cambio en la respuesta de

un fármaco debido a los mecanismos de comportamiento. Cuando un efecto reducido de un fármaco sobre la conducta se usa como medida de la tolerancia, es constante el hallazgo de que la tolerancia se desarrolla más rápidamente y en mayor grado cuando el efecto del fármaco tiene un "costo" de conducta para el organismo (cuando *deteriora su capacidad para ganar una recompensa o evitar un castigo que cuando no la deteriora*). De este modo, las ratas estudiadas diariamente sobre una correa movable bajo la influencia del alcohol, desarrollan más tolerancia a los efectos atáxicos que las ratas que reciben la misma dosis después de la prueba, y ambos grupos desarrollan tolerancia más rápidamente que las ratas que reciben una dosis aún mayor de alcohol sin las pruebas diarias. Relaciones similares entre condiciones de conducta y desarrollo de tolerancia se han observado con los opiáceos, la marihuana y las anfetaminas. La tolerancia de conducta debe entenderse en última instancia en términos farmacodinámicos.

En cualquier situación dada, varios tipos de tolerancia y más de un mecanismo pueden operar al mismo tiempo (SIEGEL, 1978).

**Dependencia:** Hace referencia a un estado en el que se requiere la presencia de la droga para mantener una o varias funciones fisiológicas. Si la droga se retira de su receptor, se presentan signos y síntomas característicos que se han denominado **síndrome de abstinencia**.

Las distinciones entre términos como habituación, adicción y dependencia son ambiguas y, a menudo, subjetivas. Por ello, un comité de la Organización Mundial de la Salud (1969) adoptó la siguiente definición de dependencia: "Estado psíquico y físico que resulta de la interacción entre un organismo vivo y una droga y que se caracteriza por respuestas comportamentales y de otro tipo que siempre incluyen compulsión por la toma de la droga para experimentar sus efectos psíquicos y algunas veces para evitar el malestar de su ausencia". La tolerancia puede presentarse o no.

### Síndrome de abstinencia.

*El tiempo requerido por cualquier fármaco para producir dependencia física está en función de varios factores, pero los más relevantes parecen ser el grado de alteración del sistema nervioso central por obra del fármaco y la continuidad de esta alteración. Sin embargo el que un síndrome de abstinencia sea o no observable clínicamente depende de:*

- Los criterios de evaluación de los signos de retirada del fármaco.
- La sensibilidad de las técnicas usadas para detectar los fenómenos de retirada.
- La velocidad a la que el fármaco se elimina de su lugar de acción.

El carácter de severidad del síndrome de abstinencia que aparece al suspender la administración de un opiáceo depende de muchos factores, entre otros están: el fármaco en sí, la dosis diaria total utilizada, el intervalo entre dosis, la duración del uso y la salud y personalidad del adicto. Por el contrario, otros trabajos demuestran que el *síndrome de abstinencia a la morfina con administración de dosis variables de la misma en espacios variables de tiempo no varían sus características (MARTIN, 1966)*. Los signos del síndrome de abstinencia, que ya estudió HIMMSELBACH (1939), pueden ser deliberados y no deliberados. Los primeros pretenden conseguir un objetivo (más fármaco) y dependen mucho del observador y del medio ambiente, por ejemplo, en medio hospitalario son muy poco frecuentes porque el sujeto sabe que, *independientemente de su conducta, se le administrará el fármaco.*

Los signos no deliberados, con morfina y heroína varían en función del tiempo que pase desde la última dosis:

- 8-12 horas: lagrimeo, bostezos y sudoración
- 12-14 h: *sueño agitado con despertar triste y agitado.*
- 14-48 h: midriasis, anorexia, pilo-erección, inquietud, irritabilidad y temblor.
- 48-72 h: apex del síndrome. Aparece mayor irritabilidad, insomnio, mayor anorexia, bostezos violentos, estornudos, lagrimeo y coriza con gran debilidad y



depresión; además aparecen alteraciones gastrointestinales (náuseas, vómitos, diarreas, espasmos), alteraciones cardiovasculares (taquicardia, hipertensión arterial), escalofríos que se alternan con rubor e hiperhidrosis, artralgias y mialgias generalizadas, alteración de la actividad pilomotora ("piel de gallina"). Se citan también signos de hiperexcitabilidad del SNC (eyaculación en varones y orgasmo en mujeres), leucocitosis y aumentos relativos de la tasa de 17-cetosteroides en orina (que disminuyen durante la adicción) (EISENMAN y col., 1958).

### Teoría del receptor.

Para la completa comprensión de los cambios que ocurren en las curvas dosis-efecto para agonistas que desarrollan tolerancia se requiere un conocimiento de la moderna teoría del receptor. La posición y la pendiente de una curva dosis-efecto puede estar afectada por factores disposicionales tales como la captación del agonista por la neurona o su velocidad de metabolización (FLEMING y col., 1973; TRENDLENBURG, 1986). Si tales factores están controlados o ausentes entonces la posición, pendiente y efecto máximo están controladas por tres parámetros. Estos parámetros son:

- (a) La afinidad del agonista por su receptor.
- (b) La densidad de receptores en el tejido.
- (c) La eficacia intrínseca o cantidad de respuesta generada por unidad de receptor ocupado.

El término eficacia intrínseca representa la cantidad de respuesta que se genera por unidad de receptor ocupado. Así la eficacia se define como la eficacia intrínseca multiplicada por la concentración de receptores presentes en el tejido. Un corolario del concepto de eficacia es el concepto de **reserva de receptores**. STEPHENSON (1956) propuso que un agonista con alta eficacia podría producir un efecto máximo en un

tejido sin ocupar todos los receptores disponibles. Esta hipótesis ha sido suficientemente demostrada ya que existe un gran número de agonistas que tienen concentraciones eficaces cincuenta ( $CE_{50}$ ) mucho más bajas que sus respectivas constantes de disociación. Las ecuaciones desarrolladas por la teoría del receptor permiten predecir los cambios que ocurrirán en una curva dosis-efecto subsecuentes a una variación en la densidad de receptores (FLEMING y WESTFALL, 1988). Esto es importante porque hay cierta tendencia en la literatura a explicar grandes cambios en la sensibilidad como consecuencia de pequeños cambios en la densidad de receptores sin considerar la relación cuantitativa. Así por ejemplo los cálculos realizados por FLEMING y WESTFALL (1988) indican que un aumento del 50 % en la densidad de receptores para un agonista sólo se manifiesta en un aumento de sensibilidad de 1.5 veces. Es por esto, que aumentos de sensibilidad de 5 a 10 veces deben estar provocados por otros cambios celulares además de los que se produzcan en la densidad de receptores.

#### Mecanismos de los cambios de sensibilidad celular.

##### ● **Desensibilización.**

En muchos sistemas celulares existe una pérdida rápida de respuesta frente a los opiáceos. Concretamente en cultivos celulares esta pérdida de respuesta parece ser una desensibilización. A efectos comparativos, se conoce el mismo fenómeno en algunos sistemas de receptores no opioides, el receptor nicotínico (KATZ y THESLEFF, 1957; CHANGEUX, 1981) y el  $\beta$ -adrenoceptor (HARDEN, 1983; SIBLEY y LEFKOWITZ, 1985; LEFKOWITZ y CARON, 1986).

La recuperación de la sensibilidad original es muy rápida cuando se retira el agonista.

Los cuatro procesos por los que se puede producir la desensibilización de los

$\beta$ -adrenoceptores son:

- (a) desacoplamiento del receptor de la proteína  $G_s$ .
- (b) *internalización del receptor.*
- (c) disminución de la densidad de receptores.
- (d) pérdida de actividad de la adenilato ciclasa.

Los tres primeros procesos son de tipo homólogo, mientras que el último es heterólogo. LEFKOWITZ y CARON (1986) presentaron un modelo para explicar los pasos comprendidos en la desensibilización homóloga. En primer lugar ocurre un desacoplamiento y fosforilación del receptor. En segundo lugar, el receptor todavía funcionalmente normal, es internalizado en la célula.

Dado que la desensibilización heteróloga no sólo se produce por los agonistas de los  $\beta$ -adrenoceptores sino también por nucleótidos de guanina, fluoruro sódico y forskolina (agentes que activan procesos de transducción a niveles intracelulares más allá del receptor) (LEFKOWITZ y CARON, 1986), se puede decir, por tanto, que es probable que exista más de un mecanismo en la desensibilización heteróloga (HARDEN, 1983). Y posiblemente algunos de estos mecanismos también estén implicados en los primeros momentos del desarrollo de la tolerancia y la dependencia opioide.

#### ● Cambios crónicos adaptativos en la sensibilidad celular.

La diferencia que separa la desensibilización de la adaptación crónica es el tiempo de su establecimiento. La mayoría de los procesos de desensibilización se desarrollan en segundos o minutos, con la excepción de la disminución de la densidad de receptores y la desensibilización heteróloga. Por el contrario, los cambios lentos de la *sensibilidad celular* no aparecen hasta pasados varios días o incluso semanas y desaparecen también de forma lenta (FLEMING y col., 1973; FLEMING, 1976, 1984; FLEMING y WESTFALL, 1988). Dichos cambios ocurren algunos días después de que se hayan alcanzado los cambios máximos en los neurotransmisores (FLEMING y col.,

1973).

Dentro de los factores que regulan la sensibilidad celular se puede citar: (a) el nivel de actividad de la célula efectora, en cuyo caso el papel de la neurona sería secundario, comportándose como un modulador fisiológico. Un dato para apoyar esta teoría de la actividad de la célula efectora, es que en músculo liso y glándulas, la hipersensibilidad inducida por la interrupción de una vía nerviosa activadora se puede prevenir o revertir con la administración crónica de una sustancia activadora diferente al neurotransmisor en cuestión. Los opiodes inhiben determinadas neuronas por una salida de  $K^+$  que hiperpolariza la membrana. Si la sensibilidad está regulada por la propia célula, la hiperpolarización crónica producida por un opioide podría inducir hipersensibilidad para agonistas excitatorios y subsensibilidad para agonistas inhibitorios incluyendo los mismos opiodes.

(b) Si el factor desencadenante de la sensibilidad fuera la célula diana, se debería saber cuál es la actividad celular crítica. Por ejemplo, en una célula muscular, habría que definir si es la frecuencia de la contracción, la frecuencia de los potenciales de acción, la frecuencia de los potenciales subumbrales de unión o los movimientos iónicos a través de la membrana, por considerar sólo unas cuantas posibilidades.

(c) Por otra parte la sensibilidad podría estar regulada por una sustancia trófica específica liberada por la neurona. Tal sustancia podría ser el neurotransmisor propiamente dicho u otra sustancia. En este último caso esta podría liberarse conjuntamente con el neurotransmisor o independientemente (FLEMING y WESTFALL, 1988).

Cualquier procedimiento que reduzca la neurotransmisión induce hipersensibilidad, pero es difícil comprender como los siguientes hechos: deplección del neurotransmisor, inhibición de su liberación, antagonistas específicos de receptores postsinápticos, etc., están relacionados con la liberación de la sustancia trófica o con su efecto.

Por el contrario el reforzamiento crónico de la neurotransmisión produce

subsensibilidad en los sistemas efectores. Desafortunadamente tanto la hiper- como la subsensibilidad han sido estudiadas en sistemas separados. Ambas (hiper- y subsensibilidad) son expresiones de mecanismos homeostáticos celulares en respuesta a los cambios que producen los tratamientos crónicos (FLEMING, 1976; FLEMING y WESTFALL, 1988).

Subsensibilidad: La subsensibilidad (tolerancia) ocurre en un gran número de tejidos inducida por un aumento crónico de la neurotransmisión. La investigación de los mecanismos celulares de la subsensibilidad se ha centrado principalmente en la unión del agonista a su receptor y aún no existen muchos trabajos que aborden conjuntamente los cambios de sensibilidad y la unión de radioligandos. El ejemplo más ampliamente estudiado es el de la inhibición de la colinesterasa. Normalmente los cambios en el número de sitios de unión para la enzima ocurren sin grandes modificaciones en la afinidad de los receptores. Dos factores hacen difícil el asegurar la importancia de los cambios receptoriales en la subsensibilidad, uno es que los cambios en el número de sitios de unión son pequeños y los investigadores han mostrado poco empeño en relacionar la magnitud de los cambios en el número de receptores con los cambios de sensibilidad de los mismos. Y el segundo es, que existen pocos estudios que reflejen variaciones de la sensibilidad y el número de sitios de unión simultáneamente (FLEMING y col., 1973).

UCHIDA y col. (1979) llegaron a la conclusión de que la disminución de número de receptores (*down-regulation*) no es el único mecanismo que interviene en el fenómeno de la tolerancia.

Hipersensibilidad: Históricamente, el reconocimiento de la hipersensibilidad adaptativa comenzó con el fenómeno de hipersensibilidad por denervación, observado por primera vez a mediados de 1900. TRENDELENBURG (1963) estableció que la denervación noradrenérgica producía dos tipos distintos de hipersensibilidad en un tejido dado: una

hipersensibilidad presináptica y otra postsináptica.

La hipersensibilidad presináptica es específica para la noradrenalina y algunas aminas relacionadas y no está relacionada con los fenómenos de tolerancia y dependencia. Sin embargo la hipersensibilidad postsináptica, que no muestra especificidad por ningún tipo de neurotransmisor, se desarrolla más lentamente. Gracias a la técnica de radioligandos se demostró que existía un aumento en la densidad de receptores postsinápticos después de la denervación (COLQUHOUN, 1974).

La hipersensibilidad adaptativa produce cambios que son compensatorios. Esto es, si se interrumpe una vía estimulatoria, el resultado es hipersensibilidad para sustancias estimuladoras. Pero si lo que se interrumpe es una vía inhibitoria, la hipersensibilidad se desarrolla para sustancias inhibidoras.

Se han propuesto alteraciones en cuatro características celulares como posibles mecanismos de la hipersensibilidad: (a) aumento de la densidad de receptores, (b) cambios en la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , (c) cambios en la adenilato ciclasa o en las proteínas G y (d) cambios en la dinámica del calcio.

Cálculos basados en la teoría de receptores determinan que los pequeños cambios que ocurren en la densidad de receptores no pueden servir de explicación para los cambios en sensibilidad que ocurren. En numerosas preparaciones de músculo liso, la hipersensibilidad se desarrolla sin ningún cambio aparente en los receptores (FLEMING y WESTFALL, 1988) lo que está en concordancia con la inespecificidad de la hipersensibilidad en ese tipo de tejido (FLEMING y col., 1973; FLEMING y WESTFALL, 1988). También se ha descrito un aumento del número de sitios de unión para receptores de neurotransmisores y moduladores asociados con el fenómeno de hipersensibilidad en neuronas (FLEMING, 1976).

Una depolarización parcial de la membrana celular contribuye al desarrollo de hipersensibilidad en deferente de cobayo (FLEMING y WESTFALL, 1988) y en arteria safena de conejo (ABEL y col., 1981). Esta depolarización se ha relacionado con la

actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , encontrándose una disminución del bombeo electrogénico.

Se ha encontrado también una alteración en el acoplamiento de los receptores con la adenilato ciclasa durante la hipersensibilidad, que lleva a un aumento de actividad de la enzima (CHIU, 1978; TORPHY y col., 1982; HAWTHORN y col., 1987)

Otros investigadores han sugerido la intervención del calcio en el proceso de hipersensibilidad en músculo esquelético, músculo cardíaco y neuronas (FLEMING y WESTFALL, 1988), pero las bases moleculares de las alteraciones del calcio son aún desconocidas, aunque algunos estudios implican a la calmodulina.

Los mecanismos vistos probablemente representen la expresión o represión génica de las proteínas implicadas. El que alguna de estas proteínas sea más susceptible en modificar la expresión o represión génica podría determinar las bases celulares para el desarrollo de hipersensibilidad en cada tipo celular (JOHNSON y FLEMING, 1989).

#### Medida de la tolerancia y la dependencia opioide.

Aunque a primera vista estos conceptos parecen sencillos, su identificación y medida han resultado siempre tareas difíciles.

Para la medida de la tolerancia se emplean dos criterios: (a) disminución de la respuesta para la misma dosis de agonista, (b) aumento de la dosis para obtener la misma respuesta.

En un típico experimento, los efectos de una dosis de morfina sobre una respuesta fisiológica se comparan en animales control y tratados crónicamente con morfina. Si la magnitud de la respuesta disminuye en los animales pretratados con morfina se considera que estos son tolerantes. Pero esta conclusión es válida sólo si no hay morfina en circulación al mismo tiempo que damos la dosis de prueba, ya que

de lo contrario los receptores opioides podrían estar ocupados y no observarse la misma respuesta por este motivo.

Lo que se necesita cuantificar en aquellos experimentos en los que cantidades grandes de morfina están presentes en la circulación, no es el efecto de una dosis de prueba de morfina, sino el parámetro fisiológico que resulta de la acción opioide.

La tolerancia empieza a decaer cuando la morfina se libera de los receptores, por ello los tejidos aislados de animales tolerantes a morfina se deben incubar en morfina para mantener los receptores ocupados durante las experiencias *in vitro*. Debemos considerar también que el mantenimiento de la tolerancia introduce dificultades en la medida de la misma ya que no se puede evaluar el efecto de la concentración de mantenimiento de la tolerancia.

Para la medida de la dependencia los criterios establecidos son: (a) aparición de alteraciones fisiológicas cuando se elimina la morfina de sus receptores, bien por discontinuidad en su administración o mediante el empleo de antagonistas.

(b) hipersensibilidad a los efectos excitatorios de estímulos externos después del síndrome de retirada.

En la mayoría de los casos el antagonista opiáceo naloxona simplemente reestablece el nivel normal de actividad de una función fisiológica (presión, frecuencia respiratoria, reflejos espinales, actividad enzimática, descarga de potenciales de acción neuronales). Pero sólo pueden ser considerados signos de abstinencia aquellos que aparecen después del tratamiento con naloxona y que no se daban antes en animales control. Son estos signos los que determinan la existencia de dependencia. Por ejemplo, cuando se administra naloxona a ratones tratados crónicamente con morfina aparece un signo típico de abstinencia que son los saltos y que no aparece en animales control (WAY y col., 1969). Una dificultad se presenta cuando el parámetro a estudiar no es susceptible de cuantificar. Por ejemplo, en estudios electrofisiológicos en los que los registros se hacen en neuronas individualizadas, la frecuencia de disparo



de potenciales de acción es bastante diferente de unas a otras, por lo que no resulta posible calcular una frecuencia media de disparo; una excepción se presenta en el *locus coeruleus*, donde las neuronas tienen una frecuencia de disparo de potenciales de acción relativamente constante.

### Mecanismos celulares de la tolerancia y la dependencia.

Se han propuesto muchas hipótesis referentes al posible mecanismo de la tolerancia y/o dependencia a los opioides. Estas incluyen: (a) alteraciones en el acoplamiento con la adenilato ciclasa o en la propia enzima, (b) cambios cualitativos o cuantitativos en los receptores y (c) depolarización parcial de la membrana.

(a) COLLIER y ROY (1974) en homogeneizados de cerebro de rata demostraron que algunos agonistas opiáceos inhibían la formación de AMPc. La inhibición era concentración-dependiente y además resultaba revertida por naloxona.

En apoyo de la hipótesis de que la adenilato ciclasa juega un papel en la dependencia, se descubrió un fenómeno denominado "pseudosíndrome de abstinencia", que se producía cuando se administraban sustancias que elevaban el AMPc tales como la 5-hidroxitriptamina (5-HT) e inhibidores de la fosfodiesterasa, y que era indistinguible del síndrome desencadenado por naloxona (COLLIER, 1974; COLLIER y col., 1974, 1975; FRANCIS y col., 1975). La naloxona incrementa los niveles de AMPc plasmáticos de ratones morfina-dependientes (MURAKI y col., 1981).

NAKAKI y col. (1981) encontraron que el tratamiento agudo con morfina incrementaba los niveles de AMPc y estos iban disminuyendo con la exposición prolongada. Pero aún no se puede generalizar que los cambios en el AMPc se producen en las mismas células sobre las que los opioides actúan.

Para estudiar más concretamente el efecto de la morfina sobre la actividad de la adenilato ciclasa, se ha desarrollado una metodología que utiliza líneas celulares híbridas de neuroblastoma x glioma (células NG108-15). Las membranas de dichas células contienen una población homogénea de receptores opioides de tipo  $\delta$  (LAW y col., 1983a) y la enzima adenilato ciclasa. En este tipo de células se ha encontrado que los opioides inhiben de forma dosis-dependiente la actividad de la adenilato ciclasa y que el efecto es revertido por la naloxona (KLEE y NIRENBERG, 1974; SHARMA y col., 1975, 1977).

SHARMA y col. (1975) y LAMPERT y col. (1976) demostraron que la administración crónica de opioides producía un aumento en la actividad de la adenilato ciclasa de carácter compensatorio. Y dicho aumento es una consecuencia del cambio en la proporción de las formas activa e inactiva de la enzima más que en la cantidad total de la misma (WILKENING y NIRENBERG, 1980).

La administración de naloxona a células tratadas crónicamente con morfina produce un aumento rebote de la actividad de la adenilato ciclasa que ha sido observado por varios autores (LAW y col., 1983a; GRIFFIN y col., 1983), pero no por otros (WÜSTER y col., 1983). Este efecto rebote en la respuesta, se debe probablemente al grado de disociación del agonista empleado, ya que la etorfina, que se libera lentamente de los receptores, no produce este efecto cuando se añade naloxona al medio (JOHNSON y FLEMING, 1989).

La adenilato ciclasa es activada e inactivada por dos proteínas fijadoras de GTP conocidas como  $G_s$  y  $G_i$  (GRIFFIN y col., 1985). Ambas proteínas son activadas por GTP y por su análogo estable Gpp(NH)p.

El uso de la toxina pertúsica ha permitido establecer que la inhibición de la adenilato ciclasa en las células NG108-15 ocurre a través de la proteína  $G_i$  inhibitoria (BURNS y col., 1983; COSTA y col., 1983; KUROSE y col., 1983). La actividad guanosina-5-trifosfatasa (GTPasa) de la membrana de las células NG108-15 se ve disminuida por el tratamiento prolongado con opioides (VACHON y col., 1985, 1987a,b).

También se ha observado tolerancia a los opioides en otras líneas celulares tumorales. En las células de neuroblastoma SHSY5Y diferenciadas en neuronas, los opioides inhiben el efecto activador que tienen la prostaglandina  $PGE_1$  y la forskolina sobre la actividad de la adenilato ciclasa (YU y SADEE, 1988). PUTTFARCKEN y col. (1988) encontraron en las membranas de las células tumorales de pituitaria 7315c que la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa estaba mediada por receptores opioides de tipo  $\mu$ .

(b) Más atención se ha prestado a la posibilidad de que la tolerancia esté asociada con la pérdida de receptores o con cambios en la afinidad de los mismos. Aunque aun existiendo una amplia literatura sobre este aspecto no existe un modelo claro.

Las primeras experiencias que postulaban la posibilidad de que cambios cualitativos estuvieran asociados con la tolerancia o la dependencia fueron hechas por TAKEMORI y col. (1973). Dichos autores calcularon la afinidad de la naloxona comparándola con la de la morfina y otros agonistas parciales *in vivo* mediante determinaciones del  $pA_2$ . Los cálculos del  $pA_2$  (-log de la concentración de antagonista que hace necesario multiplicar por dos la dosis de agonista para obtener un efecto similar al que se lograría en ausencia de antagonista) fueron desarrollados por SCHILD (1947). Sus cálculos permiten asociar los valores del  $pA_2$  con -log  $K_b$ , donde  $K_b$  es la constante de disociación del antagonista. Es interesante destacar que, en las condiciones en las que el valor del  $pA_2$  de la naloxona *in vivo* fue cambiado por pretratamiento con morfina, no hubo inducción de tolerancia (TAKEMORI y col., 1973). No obstante, TULANAY y TAKEMORI (1974a) sugirieron que el aumento de eficacia de la naloxona debida al pretratamiento con morfina podría ser un indicador del inicio y desarrollo de la tolerancia a los narcóticos.

Mas tarde KITANO y TAKEMORI (1977), en cortes de estriado de ratón, encontraron que la exposición previa a la morfina producía un aumento de la afinidad

de los receptores opioides por la naloxona. Se puede concluir, por tanto, que el pretratamiento con morfina lleva a una disminución en la afinidad de los receptores por la morfina y a un aumento en la afinidad por la naloxona.

La exposición crónica a la morfina indujo tolerancia y una disminución de la afinidad en los sitios de unión específica de morfina-[ $^3\text{H}$ ] y etorfina-[ $^3\text{H}$ ] en cortes del tronco cerebral (DAVIS y col., 1975, 1979). La unión era gradualmente reversible con la retirada del depósito de morfina. OISHI y col. (1983) identificaron dos sitios de unión para la naloxona en cerebro de ratón. Y la implantación de un depósito de morfina produjo una disminución de afinidad del 50% para el sitio de baja afinidad sin cambios en la unión máxima.

Por el contrario SIVAM y col. (1982) no encontraron cambios en la afinidad después de tratamientos agudos o crónicos con morfina, pero sí un aumento en los sitios de alta y baja afinidad. Otros autores han encontrado disminución de la unión máxima de radioligandos asociada con el tratamiento crónico sin modificaciones en la afinidad (ROGERS y EL-FAKAHANY, 1986; STEECE y col., 1986).

TAO y col. (1987) en un estudio exhaustivo concluyeron que aunque la exposición crónica a opioides produce pérdida de receptores no hay una relación directa entre el cambio en los receptores y la magnitud de la tolerancia.

Existe un gran número de autores que no han encontrado cambios en la unión de ligandos marcados a consecuencia del tratamiento crónico con opioides (HÖLLT y col., 1975; RUBINI y col., 1982; PERRY y col., 1982; MATSUI y YAMAMOTO, 1984; GEARY y WOOTEN, 1985).

Pero para complicar más la cuestión, también existen trabajos que postulan que el tratamiento crónico con opioides produce un aumento de receptores (*up-regulation*) (MOUDY y col., 1985; TEMPEL y col., 1985; TEMPEL y col., 1986).

PORRECA y BURKS (1983) sugirieron que la tolerancia está probablemente relacionada con cambios en la cadena de efectos que acoplan el receptor con la respuesta final. La disminución en la sensibilidad a sustancias inhibitorias (TAYLOR y

col., 1988), el aumento de sensibilidad a sustancias excitatorias (JOHNSON y col., 1978) y la falta de modificación en la unión de la etorfina tritiada en íleon de cobayos tolerantes a la morfina (COX y PADHYA, 1977) nos lleva a la conclusión de que la tolerancia es el resultado de una adaptación celular que debe ocurrir más allá del receptor opioide, es decir, a nivel intracelular.

Como conclusión podemos decir que los receptores opioides pueden sufrir tanto *up-* como *down-regulation*, pero la falta de acuerdo en los estudios de unión de radioligandos hacen pensar que la tolerancia y la dependencia no sólo se pueden explicar por cambios en la afinidad o densidad de los receptores.

(c) La hipótesis de que los cambios adaptativos que aparecen en el potencial de membrana podrían ser las bases de la tolerancia y la dependencia son una nueva aproximación al problema.

El tratamiento crónico con morfina produce una depolarización parcial adaptativa en células del plexo mientérico de cobayo, acercando el potencial de membrana al umbral de excitación (JOHNSON y col., 1978). La capacidad de los opiáceos para inhibir las contracciones del músculo liso intestinal puede ser debido, al menos en parte, a la hiperpolarización que producen en las neuronas de tipo S. Estudios electrofisiológicos demuestran que la morfina inhibe la descarga de potenciales de acción en las neuronas del plexo mientérico (SATO y col., 1973; DINGLELINE y col., 1974; NORTH y WILLIAMS, 1977; KARRAS y NORTH, 1981). Aunque el tratamiento agudo con opioides produce una hiperpolarización de las células ganglionares, el tratamiento crónico no modifica significativamente el potencial de membrana con respecto a animales controles. La adición de naloxona a células tolerantes reduce el potencial de membrana a valores más bajos que los encontrados en situación control (JOHNSON y NORTH, 1980).

Se puede entender que el estado de excitabilidad celular es, en cada momento, función del potencial de membrana y este es la suma de el potencial de reposo más

cualquier cambio inducido por un fármaco o agente químico (JOHNSON y NORTH, 1980).

### Sistema nervioso periférico.

La tolerancia y la dependencia inducida en animales de experimentación por tratamiento crónico con morfina son prevenidas por la administración simultánea de antagonistas opioides como la nalorfina, naltrexona o naloxona (ORAHOVATS y col., 1953; YANO y TAKEMORI, 1977; BHARGAVA, 1978). Esto implica que la ocupación del receptor es un requisito imprescindible para el desarrollo de los fenómenos de tolerancia y dependencia. Para el estudio de estos fenómenos se han utilizado dos tejidos fundamentalmente: el íleon de cobayo y el conducto deferente de ratón.

#### ● Preparaciones de íleon de cobayo.

Probablemente el primer efecto opioide *in vitro* fue observado en el íleon de cobayo. TRENDELENBURG (1917) observó que la morfina inhibía el reflejo peristáltico debido a que esta poseía receptores opioides. Los agonistas activos sobre receptores  $\mu$  y  $\kappa$ , que incluyen a los péptidos naturales Met-enkefalina y dinorfina, son capaces de inhibir el reflejo peristáltico (VAN NUETEN y col., 1977; KROMER y col., 1982; DONERER y LEMBECK, 1985). Dicha inhibición se debe producir en las neuronas más que en las células musculares, dado que las contracciones inducidas por la acetilcolina en el músculo no son afectadas por la morfina (KOSTERLITZ y ROBINSON, 1958), mientras que son inhibidas las contracciones colinérgicas inducidas indirectamente por nicotina (KOSTERLITZ y ROBINSON, 1958; GADDUM y PICARELLI, 1957; SCHAUMANN, 1955), 5-hidroxitriptamina (5-HT) (KOSTERLITZ y ROBINSON, 1958; GADDUM y PICARELLI, 1957) y neurotensina (HUIDOBRO-TORO y col., 1984).

Dado que el reflejo peristáltico era difícil de evaluar, se describió una preparación

de fibra longitudinal que respondía a diferentes estímulos contrayéndose como consecuencia de la liberación de acetilcolina provocada por las neuronas del plexo mientérico de Auerbach (PATON, 1957). Los agonistas opioides activos en receptores de tipo  $\mu$  y  $\kappa$  son eficaces en la inhibición de la transmisión colinérgica (HUTCHINSON y col., 1975; LORD y col., 1977; GOLDSTEIN y col., 1979; KOSTERLITZ y col., 1980; YOSHIMURA y col., 1982; WARD y col., 1986).

Aunque se han demostrado la presencia de receptores de tipo  $\delta$  mediante el estudio con radioligandos (LESLIE y col., 1980), estos no parecen importantes en el efecto inhibitorio en preparaciones en baño de órganos (GINTZLER y HYDE, 1984).

La transmisión de tipo no colinérgico también es inhibida por los opioides. Se sabe además, que la estimulación eléctrica de alta frecuencia (10 Hz) provoca contracciones que probablemente estén mediadas por la liberación de la sustancia P (FRANCO y col., 1979). Los opioides también inhiben la liberación de la sustancia P (HOLZER, 1984) y reducen las contracciones inducidas por dicho péptido (GINTZLER y SCALISI, 1982; BARTHO y col., 1982).

El plexo mientérico está formado por una compleja red neuronal que controla tanto las actividades del músculo longitudinal como del circular (FURNESS y COSTA, 1987). Los receptores opioides podrían estar localizados en diversos sitios: neuronas sensoriales, interneuronas y neuronas motoras, o bien en las prolongaciones de las neuronas externas a los ganglios mientéricos. Existen muchas evidencias de que los receptores involucrados en la inhibición de las contracciones colinérgicas del músculo longitudinal están localizados en las neuronas motoras. Un dato que apoya esta hipótesis es que dichas contracciones no son afectadas por el bloqueante ganglionar hexametonio, ni por la 5-HT que disminuye la transmisión excitatoria a las neuronas mientéricas (DINGLELINE y GOLDSTEIN, 1976; GALLIGAN y col., 1988). En segundo lugar, la inhibición producida por la morfina no se anula por el tratamiento con hexametonio o 5-HT, lo que indica que la morfina no actúa inhibiendo la liberación de

un neurotransmisor de forma intraganglionar. Y en tercer lugar, la inhibición no es afectada por antagonistas de receptores  $\alpha$ - o  $\beta$ -adrenérgicos (KOSTERLITZ y WATT, 1968) o por tratamiento con 6-hidroxidopamina (WARD y TAKEMORI, 1976b; FERRI y col., 1977), lo que deja claro que la morfina no actúa liberando la noradrenalina presente en los nervios extrínsecos que inervan los ganglios mientéricos.

- Mecanismos celulares de la inhibición opioide en el íleon.

Los opioides pueden inhibir la liberación de neurotransmisores excitatorios por dos mecanismos básicamente. Pueden actuar en el mecanismo de liberación propiamente dicho, disminuyendo la liberación de acetilcolina que ocurre en cada potencial de acción (PATON, 1957; SCHAUMANN, 1957; PATON y ZAR, 1968) y pueden, en segundo lugar, reducir la excitabilidad de las neuronas motoras.

Utilizando la técnica de registro con electrodos extracelulares, se ha llegado a conocer que la morfina inhibe la descarga de potenciales de acción en neuronas mientéricas (SATO y col., 1973; DINGLELINE y col., 1974; NORTH y WILLIAMS, 1977; KARRAS y NORTH, 1981). Dado que la inhibición persiste aún cuando la transmisión ganglionar ha sido bloqueada, DIGLENDINE y GOLDSTEIN (1975, 1976) han postulado una acción directa de la morfina sobre la excitabilidad neuronal. Los agonistas que actúan sobre receptores  $\mu$  hiperpolarizan la membrana celular y producen un aumento de la conductancia para el  $K^+$  (MORITA y NORTH, 1982; SUPRENANT y NORTH, 1985). Dicha hiperpolarización se da fundamentalmente en las neuronas de tipo S (NORTH y TONINI, 1977; NORTH y col., 1979; MORITA y NORTH, 1982; JOHNSON y col., 1987c).

El mecanismo por el que los agonistas de tipo  $\kappa$  inhiben las contracciones mediadas por los nervios colinérgicos es más oscuro. Dichos agonistas no afectan el potencial de reposo, pero disminuyen la corriente de entrada de calcio en las neuronas de tipo AH (CHERUBINI y NORTH, 1985).



Los mecanismos bioquímicos intracelulares que regulan la acción inhibitoria de los agonistas  $\mu$  y  $\kappa$  en las neuronas mientéricas y la de los agonistas del receptor  $\delta$  en las neuronas submucosas están aún por conocerse. Muchos receptores hormonales y de neurotransmisores están acoplados a las proteínas G como un primer paso en la transducción del efecto farmacológico (RODBELL, 1980; GRAZIANO y GILMAN, 1987; GILMAN, 1987; CASEY y GILMAN, 1988).

Para el estudio del acoplamiento con las proteínas G se han mostrado eficaces dos toxinas: la pertúsica y la colérica. La toxina pertúsica ha sido empleada frecuentemente para estudiar el papel de las proteínas G en la transducción (UI, 1984). Esta toxina cataliza el paso de ADP-ribosa a diversos tipos de proteínas G. Después de la ribosilación, las proteínas G son inactivas como transductoras de señales intracelulares.

En el íleon los resultados obtenidos con la toxina son contradictorios. Por una parte COLLIER y col. (1983) y LUX y SCHULZ (1986) pusieron de manifiesto que el pretratamiento de los cobayos con la toxina pertúsica no alteraba el efecto depresor de la normorfina sobre la contracción del músculo longitudinal. Pero por otra parte TUCKER (1984) y LUJAN y col. (1984) encontraron que los efectos inhibitorios eran prevenidos después de tratamiento con la toxina.

Aún así, se han obtenido experiencias más concluyentes que ponen de manifiesto la relación de las proteínas G con la acción de los opioides en el íleon mediante registros electrofisiológicos de las neuronas del plexo submucoso. La hiperpolarización de esas neuronas por agonistas  $\delta$  se prolongaba por la inyección intracelular de un análogo no hidrolizable del GTP (NORTH y col., 1987) y dicha hiperpolarización era prevenida por la inyección intracelular de la toxina o por el tratamiento de los tejidos con la misma

El AMPc se ha considerado como un mensajero intracelular de las respuestas mediadas por la unión de los opioides a sus receptores (COLLIER y ROY, 1974; COLLIER, 1980; SCHRAMM y SELINGER, 1984; WORLEY y col., 1987; NEHER, 1988).

JEITNER y COSTA (1989) han demostrado que la morfina inhibe la actividad de la adenilato ciclasa que se encuentra presente en el íleon. La hiperpolarización de las neuronas mientéricas producida por el agonista  $\mu$  (D-Ala<sup>2</sup>,N-Me-Phe<sup>4</sup>,Gly<sup>5</sup>-ol)-encefalina (DAMGO) no es afectada por la forskolina, dibutilil AMPc o isobutilmetilxantina (JOHNSON y col., 1989a). Aunque la teofilina y la isobutilmetilxantina (inhibidores de la fosfodiesterasa) previenen los efectos inhibitorios de la morfina sobre la contracción inducida por acetilcolina (SAWYNOK y JHAMADANDAS, 1976, 1979), los inhibidores de la fosfodiesterasa diferentes de las xantinas no los previenen. Estos mismos autores sugirieron que las acciones de la teofilina y de la isobutilmetilxantina no estaban relacionadas con la inhibición de la fosfodiesterasa pero posiblemente lo estuvieran con la movilización de  $\text{Ca}^{++}$ .

Ninguno de los experimentos anteriores apoya la idea de que los efectos agudos de los opioides sobre la neurotransmisión y la excitabilidad en el íleon están mediados por la disminución intracelular de AMPc.

En la preparaciones FL-PM procedentes de cobayos tratados con morfina y mantenidas en solución conteniendo opioides, la naloxona provoca una fuerte contracción del músculo que no se observa en las preparaciones de los animales control (SCHULZ y HERZ, 1976).

La contracción es debida a una liberación brusca del agonista de su receptor y es empleada como un índice de dependencia. Dicha contracción es bloqueada por tetrodotoxina (FREDERICKSON y col., 1976), indicando que la excitación del músculo es una consecuencia indirecta de la descarga de potenciales en las neuronas mientéricas. La contracción también es disminuida o abolida por atropina (SCHULZ y HERZ, 1976), lo que indica que es debida a la liberación de acetilcolina procedente de las neuronas motoras que inervan el músculo longitudinal. Tampoco se ve afectada la contracción por el hexametonio. Así pues, se puede decir que la transmisión colinérgica intragangliónica, no interviene en la expresión de la dependencia.

Además de la acetilcolina, también la sustancia P se ha implicado en esta respuesta contráctil. Parte de la respuesta contráctil inducida por naloxona es resistente a la hioscina y es reducida o abolida después de la desensibilización del músculo liso a la sustancia P (GINTZLER, 1980; TSOU y col., 1982), o después del tratamiento con un antagonista de la sustancia P (TSOU y col., 1985). Un trabajo reciente ha mostrado que por inmunoreactividad la sustancia P está implicada en la contracción que ocurre en el plexo durante el síndrome de abstinencia (WANG y TSOU, 1989). Las neuronas mientéricas que inervan el músculo circular también se activan durante la respuesta de abstinencia (JOHNSON y col., 1989b). Esta respuesta, tal y como ocurre en el músculo longitudinal, es disminuida o abolida por tetrodotoxina y hioscina. Tal hecho demuestra que la acetilcolina está implicada en la excitación de la musculatura circular del íleon.

Las preparaciones de plexo submucoso tratadas durante cinco días con el agonista  $\delta$  DADLE no muestran ninguna contracción después de la administración de naloxona (VINAYEK y col., 1985). En otras especies, como ocurre en la rata, la mucosa está implicada en el síndrome de abstinencia (COUPAR, 1987). No sólo se observan signos de dependencia en el íleon cuando se trata éste con naloxona, sino cuando se elimina el opioide de sus receptores de forma gradual por lavados repetidos de los tejidos con una solución libre de opioides. Ocurren contracciones fásicas muy marcadas tanto en el músculo longitudinal como en el circular. Después de que la morfina ha sido eliminada las contracciones que siguen son bien aparentes, lo que indica que los cambios celulares asociados con la dependencia persisten *in vitro* durante al menos varias horas (JOHNSON y col., 1987a). Bajo esas condiciones, el íleon muestra hipersensibilidad a cualquier agente o procedimiento que produzca contracciones colinérgicas del músculo longitudinal. También las contracciones neurogénicas producidas por el aumento de la concentración de  $K^+$  extracelular (JOHNSON y col., 1978) o por estimulación eléctrica (SCHULZ y CARTWRIGHT, 1974; JOHNSON y col., 1978; COX, 1979) de las neuronas mientéricas están

significativamente aumentadas. Las contracciones producidas por la administración directa de acetilcolina sobre el músculo no cambian, lo que indica que los mecanismos de la subsensibilidad inespecífica están localizados en las neuronas del plexo mientérico.

Se ha podido inducir dependencia en el íleon incubando las preparaciones procedentes de cobayos control con opioides *in vitro*. LUJAN y RODRIGUEZ (1981) han demostrado que la incubación durante 30 minutos con normorfina es suficiente para que la naloxona induzca una contracción en el íleon. Como esa contracción no se ha visto afectada por atropina, pero se ha reducido con antagonistas de la sustancia P, se ha propuesto a dicha sustancia como el mediador principal de la respuesta contráctil de abstinencia.

Podemos concluir, que los experimentos *in vitro* aportan dos avances en la comprensión del fenómeno de la dependencia. Por un lado, que los mecanismos celulares capaces de desarrollar dependencia residen en el plexo mientérico, independientemente del SNC, y por otro, que estos se inician muy rápidamente después de la ocupación de los receptores opioides. Esto está de acuerdo con la observación de que la naloxona produce contracciones en el íleon extraído a las dos horas de una sola inyección de morfina (CHAHN y THORNTON, 1987; CHAHN, 1988).

Los estudios que han abordado los mecanismos celulares de la dependencia en el íleon, muestran que después del síndrome de abstinencia hay una hipersensibilidad a los efectos excitatorios de la 5-HT. Se ha propuesto que la hipersensibilidad en el íleon resulta de un incremento adaptativo en el número de receptores de 5-HT. Pero no sólo la 5-HT es capaz de desarrollar hipersensibilidad en las neuronas entéricas. También se han encontrado hipersensibilidad para la PGE<sub>1</sub> (SCHULZ y HERZ, 1976), la nicotina (JOHNSON y col., 1978), la estimulación eléctrica (SCHULZ y CARTWRIGHT, 1974; JOHNSON y col., 1978; COX, 1979) y el K<sup>+</sup> (JOHNSON y col., 1978).

Mediante registros intracelulares de las neuronas entéricas se ha demostrado que existe una depolarización durante el síndrome de abstinencia desencadenado por naloxona (JOHNSON y col., 1987c). De los dos tipos de neuronas mientéricas definidas electrofisiológicamente (S y AH) (HIRST y col., 1974), sólo las S son afectadas por el síndrome de abstinencia, siendo algunas de ellas interneuronas y otras neuronas motoras. Pero el mecanismo que dirige este proceso no está aclarado. En muchas neuronas la magnitud de la depolarización disminuye cuando la transmisión es bloqueada por disminución de la concentración extracelular de  $Ca^{++}$  (JOHNSON y col., 1987b). Esto sugiere que la depolarización se debería en parte a la liberación de neurotransmisores excitatorios que producen depolarizaciones lentas en las neuronas S (JOHNSON y col., 1980; BORNSTEIN y col., 1984). Una explicación alternativa sería que la depolarización podría estar producida por un proceso dependiente de  $Ca^{++}$  intrínseco a la neurona empalada. La depolarización que ocurre no está asociada a cambios en la conductancia de la membrana, por lo que se puede deducir que se genera en lugares distantes al soma. Es posible que la depolarización ocurra como consecuencia del funcionamiento de bombas iónicas dependientes de energía pero la importancia de estas en el control del potencial de membrana en el plexo mientérico no se ha estudiado en detalle.

Otra de las "herramientas" químicas que se han empleado para el estudio de los mecanismos celulares de la dependencia han sido las toxinas colérica y pertúsica. La toxina pertúsica administrada a los cobayos evita la contracción inducida por naloxona en las preparaciones FL-PM procedentes de animales tratados crónicamente con el agonista  $\mu$  fentanilo y por tanto impide el desarrollo de dependencia (LUX y SCHULZ, 1986). Los mismos resultados se han obtenido cuando se añade la toxina pertúsica *in vitro* a preparaciones FL-PM incubadas con normorfina (COLLIER y col., 1983).

Desafortunadamente, estas observaciones son difíciles de interpretar debido a la falta de acuerdo de los efectos de la toxina pertúsica en las acciones agudas de los

opioides.

Las preparaciones FL-PM procedentes de cobayos tratados crónicamente con fentanilo e incubadas con la toxina colérica, presentan una disminución en la respuesta contráctil inducida por naloxona. También resulta reducida la contracción inducida en preparaciones control por la 5-HT, la neurotensina y la PGE<sub>1</sub>.

También las prostaglandinas (PG) parecen jugar un papel en el fenómeno de la dependencia ya que la indometacina, un inhibidor de la síntesis de PG, redujo la contracción característica de abstinencia en el íleon (M.A. JOHNSON y col., 1988).

La tolerancia que se observa después del tratamiento prolongado de los cobayos con morfina consta, al menos, de dos componentes. Un componente que se manifiesta antes de la inducción de abstinencia, que es importante en cuanto a grado de tolerancia y que se pierde en minutos u horas después de la retirada del opioide del receptor. El segundo componente de la tolerancia es más modesto en su grado y desaparece más lentamente al cabo de unos días, siendo inespecífico. Dado que los intervalos de la desaparición de la tolerancia específica e inespecífica son diferentes, se puede pensar que el desarrollo de ambas también tenga periodos diferentes. De hecho algunos estudios han demostrado tolerancia en la preparación FL-PM después de una única inyección de morfina (WARD y TAKEMORI, 1976a) o después de la incubación de las preparaciones FL-PM procedentes de cobayos control con morfina (SCHAUMANN, 1955; SHOHAM y WEINSTOCK, 1974; ALDUNATE y col., 1975; HAMMOND y col., 1976; OPMEER y VAN REE, 1978; REZVANI y col., 1983; ALGUACIL y col., 1987). REZVANI y col. (1983), que estudiaron el desarrollo y especificidad de la tolerancia con cierto detalle, llegaron a la conclusión de que un período de exposición de 4 horas era suficiente para promover los cambios que llevan a la tolerancia específica pero no para la tolerancia inespecífica.

La tolerancia se ha estudiado siguiendo los mismos métodos empleados para el estudio de la dependencia. Este fenómeno decae rápidamente (2-3 horas) después

de la comprobación de dependencia en el tejido (SCHULZ y HERZ, 1976; COX, 1978) y es además relativamente selectivo para el opioide empleado. Aún así, se mantiene un grado bajo de tolerancia que tarda en desaparecer algunos días (COX, 1978; SCHULZ y col., 1974). Mientras que la tolerancia que se observa antes de la inducción de la respuesta de abstinencia es relativamente específica, después del mismo, dicha tolerancia no sólo se manifiesta para la morfina y otros agonistas  $\mu$  sino también para sustancias como la adrenalina (GOLDSTEIN y SCHULZ, 1973; GILLAN y col., 1979), noradrenalina (WARD y TAKEMORI, 1976b), clonidina (GILLAN y col., 1979; TAYLOR y col., 1988a), dopamina (GOLDSTEIN y SCHULZ, 1973), 2-cloroadenosina (TAYLOR y col., 1988a), ATP (GILLAN y col., 1979), e incluso para el etanol (MAYER y col., 1980). Estos hallazgos son explicables en términos de eficacia intrínseca de cada agonista y de densidad de receptores. La no especificidad de la tolerancia sugiere una adaptación celular más allá del receptor. CHAVKIN y GOLDSTEIN (1984) y PORRECA y BURKS (1983), estudiaron la tolerancia en preparaciones FL-PM aisladas de cobayos tratados crónicamente con morfina e incubadas en solución libre de morfina y además sometida a varios lavados. Al cabo de una hora el agente alquilante irreversible de los receptores opioides  $\beta$ -clornaltrexamina, se mostró más potente en reducir el efecto inhibitorio máximo en las preparaciones tolerantes que en las controles. Esto implica que ocurre bien una disminución en la fracción de receptores de reserva o una disminución en la efectividad del mecanismo intracelular que une el receptor opioide con la acción inhibitoria de la morfina.

En las preparaciones de íleon no se han encontrado cambios en el número o afinidad de los sitios de unión para los opioides (RUBINI y col., 1982). Una dificultad para este tipo de estudios es que la unión se determina después de que el agonista que induce la tolerancia haya sido desalojado de su receptor. Debido a que la tolerancia selectiva desaparece rápidamente después del síndrome de abstinencia, los receptores deberían reversionar rápidamente a su estado normal. Como quiera que sea, esto no ocurre y se piensa que la tolerancia se debe a un desacoplamiento entre el receptor opioide

y su sistema efector intracelular (RUBINI y col., 1982). Hasta el momento esos sistemas no han sido descubiertos.

Agonistas que actúan en diferentes receptores pueden tener mensajeros intracelulares comunes (NEHER, 1988; NICOLL, 1988). Por ello una alteración en el efector intracelular unido al receptor  $\mu$  puede dar lugar a tolerancia cruzada con otros agonistas. El agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico clonidina, por ejemplo, tiene similares efectos sobre las neuronas S que la morfina. Produce una hiperpolarización asociada con un aumento de la conductancia para el  $K^+$  (SUPRENTANT y NORT, 1985). Si los receptores  $\mu$  y  $\alpha_2$  están unidos a los mismos canales de  $K^+$  a través de un efector común, una alteración en la vía común podría resultar en tolerancia para las dos sustancias.

Un mecanismo alternativo para la tolerancia inespecífica asume que el sitio de reconocimiento del opioide y su efecto intracelular no se alteran en el ileon tolerante. Aún así, las neuronas son hiperexcitables después del síndrome de abstinencia, en parte debido a una depolarización de la membrana (JOHNSON y col., 1987b).

- Conducto deferente de ratón.

El conducto deferente de ratón es otra de las preparaciones más utilizadas para el estudio de los opioides. En él existen receptores opioides de tipo  $\mu$ ,  $\delta$  y  $\kappa$  a través de los cuales se inhiben las contracciones inducidas por noradrenalina. Mediante estímulo eléctrico se desencadenan contracciones que son inhibidas por fentolamina y bretilio pero no por hioscina, lo que demuestra que el neurotransmisor implicado es la noradrenalina. La constante de disociación para la naloxona es similar a la encontrada en la preparación de ileon, lo que apoya la idea de que los receptores implicados son del mismo tipo (HENDERSON y col., 1972; WATERFIELD y col., 1977).

Al contrario de lo que ocurre en la preparación de ileon, en el conducto deferente de ratones tratados crónicamente con morfina, la naloxona no desencadena contractura muscular en la preparación (VARGAS y col., 1987).



### Sistema nervioso central.

En el SNC las acciones más importantes de los opiáceos están producidas fundamentalmente por inhibición de ciertas neuronas (NORTH, 1979; NICOLLL, 1982; FRENCH y WILLIAMS, 1989). Existen pocos autores que hayan investigado las acciones crónicas de los opioides en la excitación de neuronas aisladas. Las estructuras más estudiadas han sido la médula espinal, las células del ganglio dorsal cervical, el *locus coeruleus*, el hipocampo, el estriado y la corteza.

#### ● **Médula espinal.**

En experiencias *in vivo* en las células del asta dorsal de la médula se ha encontrado tolerancia al efecto de la morfina en registros extracelulares de los potenciales de acción en gatos (JOHNSON y DUGGAN, 1981a). En la médula, los receptores opioides están más concentrados en la sustancia gelatinosa, resultando disminuida la excitabilidad de las fibras amielínicas preferentemente por la administración de morfina.

HENDRY y col. (1987) han identificado un factor neurotrófico en la médula de ratas morfino-dependientes y han sugerido que podría estar producido como una respuesta a la interrupción crónica de la neurotransmisión por la morfina.

También se produce el fenómeno de dependencia en la médula espinal, manifestado por un aumento de la respuesta a la estimulación eléctrica después de la administración de naloxona (JOHNSON y DUGGAN, 1984).

Se han hecho estudios *in vitro* en cultivos de médula fetal de ratón y ganglio dorsal. En los mismos la estimulación eléctrica genera una respuesta debida a un conjunto de neuronas. La morfina y los péptidos opioides causan una disminución estereoselectiva y antagonizada por la naloxona de la respuesta de dichas neuronas (CRAIN y col., 1977, 1978). Registros de la actividad eléctrica intracelular han mostrado

que los opioides disminuyen la duración de los potenciales de acción calcio dependientes en los somas neuronales del ganglio dorsal (CHALAZONITIS y CRAIN, 1986; CRAIN, 1988) y que los receptores implicados están acoplados a una proteína G inhibitoria. Este último hecho se ha comprobado porque el tratamiento con la toxina pertúsica disminuía el efecto depresor de la morfina (CRAIN y col., 1987).

GREGA y col. (1987) han demostrado que diferentes mecanismos efectores intracelulares pueden converger en el mismo canal iónico. La inhibición de la adenilato ciclasa que produce la morfina en el ganglio dorsal está mediada por receptores de tipo  $\kappa$ , resultando ineficaces los agonistas de tipo  $\mu$  (ATTALI y col., 1989). Cuando los cultivos se mantienen en presencia de morfina durante varios días se desarrolla tolerancia y dependencia. El pretratamiento concomitante con naloxona impide la aparición las acciones crónicas de la morfina, lo que demuestra que la ocupación de receptor es un requisito imprescindible para el desarrollo de los cambios adaptativos (CRAIN y col., 1979). Además de los opioides, otras sustancias que incluyen la 5-HT, noradrenalina, carbacol, anestésicos locales y alcohol también inhiben la respuesta de los cultivos de ganglio dorsal, lo que implicaría que otros receptores no opioides podrían estar relacionados con la tolerancia (CRAIN y col., 1982).

Existe otra preparación del ganglio dorsal con células disociadas; en ella los agonistas opioides  $\mu$  y  $\delta$  disminuyen la duración del potencial de acción de  $\text{Ca}^{++}$  por activación de la conductancia para el  $\text{K}^+$  (WERZ y MACDONALD, 1985), mientras que los agonistas  $\kappa$  inhiben directamente la corriente de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  (GROSS y MACDONALD, 1987).

También se ha encontrado tolerancia y dependencia en cortes de médula espinal (YOSHIMURA y NORTH, 1983).

● *locus coeruleus.*

Es un núcleo compacto que tiene más de la mitad del contenido de

noradrenalina de cerebro y que emite proyecciones a otras muchas áreas cerebrales (SWANSON y HARTMAN, 1975; FOOTE y col., 1983). Se le ha relacionado con muchas de las manifestaciones del síndrome de abstinencia (REDMOND y KRISTAL, 1984; GRANT y col., 1988).

PEPPER y HENDERSON (1980) encontraron que la aplicación aguda de opioides causaba una hiperpolarización dependiente de la concentración en cortes de cerebro, que contenían el *locus coeruleus*. Esto ha permitido la realización de curvas dosis-respuesta para diferentes agonistas, llegándose a la conclusión de que el receptor implicado en esta hiperpolarización es el  $\mu$  (WILLIAMS y NORTH, 1984). Simultáneamente a la hiperpolarización aumenta la conductancia para el  $K^+$ , resultado que se ha visto para agonistas de tipo  $\mu$  mediante la técnica de parches de membrana (*patch clamp*) (MIYAKE y col., 1989).

CHRISTIE y col. (1987) han encontrado que la tolerancia en cortes del *locus coeruleus* es específica para los agonistas  $\mu$  y que la misma permanece sin alterar varias horas después del síndrome de abstinencia.

También se desarrolla tolerancia al efecto inhibitor de la morfina sobre la frecuencia de disparo de los potenciales de acción neuronales (AGHAJANIAN, 1978). La administración de naloxona produce un aumento de la frecuencia de disparo en las neuronas del *locus coeruleus* después de un tratamiento crónico con morfina tanto *in vivo* como *in vitro*, y esto se ha tomado como un indicativo de dependencia.

Los experimentos *in vivo* no indican si la hiperexcitabilidad que ocurre durante la abstinencia se inicia en las neuronas del *locus coeruleus* o se produce indirectamente como resultado de una excitación de las aferencias de entrada. Gracias a los experimentos de ANDRADE y col. (1983), que emplearon la técnica de disrupción de aferencia al *locus coeruleus in vitro*, se puede concluir que este no es la diana para los cambios que ocurren en la dependencia, ya que la naloxona no es capaz de generar el aumento de la frecuencia de disparo de las neuronas que se había visto en las

experiencias *in vivo*.

#### ● Hipocampo.

Se encuentra en esta estructura una excepción a la regla general de que los opioides inhiben el disparo de las neuronas (NORTH, 1979; DUGGAN y NORTH, 1983). Los opioides excitan las células piramidales del hipocampo mediante una inhibición de vías inhibitorias que contactan con las células piramidales (MASUKAWA y PRINCE, 1982; NICOLL, 1982). Dicha excitación es revertida por naloxona y está mediada por receptores  $\mu$  y  $\delta$  (DUNWIDDIE y col., 1987).

Se han demostrado fenómenos de tolerancia y dependencia en el hipocampo (GAHWILER, 1981; ROBINSON y col., 1982; ZIEGLGÄNSBERGER y col., 1982).

CORRIGALL y col. (1981) encontraron que la magnitud de la tolerancia era similar en cortes tolerantes a la morfina e incubados con  $0.2 \mu\text{M}$  de morfina o en solución libre de morfina durante al menos una hora.

#### ● Estriado.

Como en muchas otras áreas cerebrales, los opioides también disminuyen la descarga de potenciales de acción registrados extracelularmente en neuronas de estriado (ZIEGLGÄNSBERGER y FRY, 1976; FREDERICKSON y NORRIS, 1976; FRY y col., 1980a) pero la naloxona no antagoniza ese efecto (PERKINS y STONE, 1980).

Los mecanismos que determinan esa disminución de disparo neuronal no han sido determinados, pero se ha encontrado que los opioides son capaces de disminuir la actividad de la adenilato ciclasa, o la producción de AMPc, en el estriado (LAW y col., 1981); KELLY y NAHORSKI, 1986; CHILDERS, 1988). La inhibición de la enzima depende de GTP y se puede impedir por el tratamiento con la toxina pertúsica (ABOOD y col., 1985; CHILDERS, 1988), lo que sugiere que la inhibición de la adenilato ciclasa

se produce por el acoplamiento de los receptores opioides con la proteína  $G_i$  inhibitoria.

Resulta difícil medir la tolerancia y la dependencia en estudios electrofisiológicos. Así, en el estriado, la aplicación de morfina produce una disminución de la frecuencia de disparo en la mitad de las neuronas procedentes de ratas control, mientras que en las que proceden de ratas tratadas con morfina, la mayoría de las neuronas no responden a la morfina (ZIEGLGÄNSBERGER y FRY, 1976). La proporción de neuronas que se excitan por la aplicación microelectroforética de naloxona es mayor en las ratas tratadas con morfina que en las ratas control (FRY y col., 1980b). Esta excitación se considera como un signo de abstinencia.

#### ● **Corteza.**

La mayoría de los estudios de los efectos de los opioides sobre las neuronas corticales se han hecho con electrodos extracelulares en animales anestesiados. La administración microelectroforética de morfina o encefalinas produce una disminución de la frecuencia de disparo de las neuronas de la corteza que es antagonizada por naloxona (SATOY y col., 1974, 1975, 1976a; FREDERIKSON y NORRIS, 1976; PALMER y col., 1978).

Los registros eléctricos intracelulares en cortes de corteza revelan que el DADLE no altera el potencial de membrana pero disminuye el potencial postsináptico excitatorio inducido por estimulación eléctrica o por aferencias neuronales (SUTOR y ZIEGLGÄNSBERGER, 1984).

El tratamiento crónico con morfina evita su efecto inhibitorio sobre el disparo neuronal, lo que representa un signo de tolerancia (SATOY y col., 1974, 1975, 1976b). Pero existen dificultades para interpretar estos resultados, pues el esquema del tratamiento crónico mantiene unos niveles de morfina circulantes que podrían evitar la acción de la morfina aplicada electroforéticamente.

Para investigar si el tratamiento crónico con morfina inducía signos de abstinencia, FRY y col. (1978, 1980a,b) compararon el efecto de la naloxona en ratas control y tratadas crónicamente con morfina. En las ratas pretratadas, la administración microelectroforética de naloxona causó un aumento en la excitación producida por el l-glutamato en 6 de 17 neuronas estudiadas. En los animales controles, la excitación por naloxona se observó sólo en una de las doce células estudiadas.

La hiperexcitabilidad de las neuronas corticales se ha demostrado por la aplicación de l-glutamato a neuronas procedentes de animales control y pretratados crónicamente con morfina; resultando en las segundas una hipersensibilidad al l-glutamato. Esta hipersensibilidad era inespecífica ya que la acetilcolina producía los mismos efectos de aumento de la frecuencia de disparo neuronal. Por ello estos autores han propuesto que los cambios adaptativos deben ocurrir más allá del nivel del receptor, resultando un mecanismo similar al ya visto para el caso de las neuronas del plexo mientérico procedentes de cobayos tolerantes a la morfina (SATOY y col., 1976b).

#### Alteraciones en los sistemas de neurotransmisores.

##### ● **Encefalinas.**

Durante la administración crónica de opioides se pueden producir déficits de opioides endógenos por un mecanismo de autorregulación. Dichos déficits pueden contribuir a los signos agudos o prolongados de abstinencia. Si la tolerancia se produjera en los autorreceptores, debería aumentar la liberación de encefalinas después de la interrupción de la administración de opioides.

SIMANTOV y SNYDER (1976) demostraron que la administración aguda de morfina aumentaba las encefalinas en un 25 % y la administración durante 5 días doblaba el porcentaje. De cualquier manera, no se encontraron modificaciones de los niveles de encefalinas en estudios posteriores (CHILDERS y col., 1977; SHANI y col.,

1979).

Efectos similares a los producidos por los agonistas opiáceos se encuentran al disminuir la actividad encefalinasa (SIMMONS y RITZMANN, 1980; MILLER y col., 1977; ROQUES y col. 1980; MARTIN y VOIGHT, 1982; DE LA BAUME y col. 1982). La administración crónica de morfina aumenta la afinidad de las encefalinases en un 59 % (MALFROY y col., 1978).

La aprotinina, un inhibidor de peptidasas, disminuye los signos que se desencadenan por la naloxona en ratas tratadas crónicamente con morfina. Y una mezcla de aprotinina y bacitracina (otro inhibidor de peptidasas) anula por completo el síndrome de abstinencia (PINSKY y col., 1982).

#### ● **Acetilcolina.**

El tratamiento con opioides aumenta los niveles de ACh cerebrales mostrando tolerancia al tratamiento crónico (GIARMAN y PEPEU, 1962; HANO y col., 1964; HOWES y col., 1970; LARGE y MILTON, 1970; SHARKAWI, 1972; DOMINO y WILSON, 1973; JHAMANDAS y SUTAK, 1980). Durante el síndrome de abstinencia aumenta el recambio de ACh. Los antagonistas colinérgicos aumentan la severidad del síndrome de abstinencia, mientras que los antagonistas muscarínicos y nicotínicos atenúan algunos aspectos de síndrome (MARTIN y EADES, 1967; BHARGAVA y WAY, 1972; VAZQUEZ y col., 1974).

#### ● **Acido $\gamma$ -aminobutírico (GABA).**

Tanto la administración de  $\beta$ -endorfina como de morfina aumentan los niveles de GABA en el *globus pallidus* (MORONI y col., 1978). La tolerancia a la morfina está asociada con un aumento del número de sitios de unión para el GABA en la médula espinal, diencefalo, estriado y cerebelo, pero el síndrome de abstinencia desencadenado por naloxona no modifica los sitios de unión (SIVAM y col., 1981, 1982).

La bicuculina no previene el síndrome de abstinencia, pero sí lo hace la picrotoxina y el diazepam a dosis sedativas (HYNES y col., 1980). Clínicamente ambos, el diazepam y el baclofen, un análogo del GABA que tiene efectos agonistas y antagonistas GABA, disminuyen la severidad del síndrome de abstinencia en humanos (LITT y col., 1971; JAFFE y col., 1982).

Las interacciones GABA-opioides son complicadas y más si se tiene en cuenta que la naloxona a dosis altas actúa como antagonista gabaérgico (GUMULKA y col., 1979; DINGLELINE y col., 1978).

#### ● 5-hidroxitriptamina.

El aumento de la velocidad de recambio (*turnover*) y de la síntesis de 5-HT en animales tratados de forma aguda y crónica con morfina determina una relación entre el sistema y las acciones de los opioides, aunque en relación con la tolerancia y la dependencia, los resultados no son definitivos.

La administración intraventricular de 5,6-dihidroxitriptamina (DHT) (destructor de las neuronas serotoninérgicas), disminuye los signos de tolerancia y dependencia (HO y col., 1973).

La para-clorofenilamina (inhibidor de la síntesis de serotonina) junto con otros antagonistas de serotonina produce similares efectos en algunos (HO y col., 1972; CERVO y col. 1981) pero no en todos los estudios (CHENEY y GOLDSTEIN, 1971a; CHENEY y col, 1971).

Las alteraciones que ocurren en el sistema serotoninérgico pueden estar asociadas con las que acontecen en el sistema noradrenérgico por las uniones anatómicas y fisiológicas que existen entre los núcleos del rafe (serotoninérgicos) y el *locus coeruleus* (noradrenérgico) (SVENSSON y col., 1975; GALLAGER y AGHAJANIAN, 1976; PICKEL y col., 1977; SEGAL, 1979; BARABAN y AGHAJANIAN, 1980, 1981; McRAE-DEGUERCE y col., 1982).



### • Dopamina.

Los opioides actúan sobre las neuronas dopaminérgicas a través de receptores opioides (SCHWARTZ y col. 1978). Pero estas no responden de forma homogénea a la administración de opioides. Resultando aumentado el recambio de dopamina en los sistemas mesolímbico y nigro-estriatal y disminuido en los sistemas tuberoinfundibular y cortical (CLOUET y RATNER, 1970; KUSCHINSKY y HORNYKIEWICZ, 1974; MOLEMAN y BRUINELS, 1976; BIGGIO y col., 1978; PERSSON, 1979; DEYO y col. 1979).

La L-DOPA, la apomorfina, y la anfetamina, que aumentan la actividad dopaminérgica, incrementan el síndrome de abstinencia opioide. Y los antagonistas, como el haloperidol, lo disminuyen (LAL y col. 1978; GIANUTSOS y col., 1974; HYNES y col. 1978). Los signos que son disminuidos en ratón por estos antagonistas son el salto, la rumia, el retorcimiento y la agresión.

El hecho de que sólo algunos signos de comportamiento se vean afectados sugiere que la dopamina tiene el papel modulador pero no primario en el síndrome de abstinencia.

Muchos de los métodos que habían implicado a mecanismos dopaminérgicos no fueron capaces de distinguir entre los sistemas de dopamina, GABA, noradrenalina y opioides.

Las butirofenonas, cuyos efectos se han relacionado con el sistema dopaminérgico en el síndrome de abstinencia, se unen a los receptores opioides con una afinidad comparable a la de la meperidina (CREESE y col., 1976, CLAY y BROUGHAM, 1975).

El haloperidol previene el síndrome de abstinencia y su efecto es bloqueado por la naloxona (LAL y HYNES, 1978). Varios agonistas y antagonistas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  adrenérgicos afectan la función dopaminérgica (ANDEN y GRABOWSKA, 1976; SVENSSON y AHLENIUS, 1982).

### • Noradrenalina.

El primero en describir una relación entre opioides y noradrenalina fue VOGT (1954), quién encontró una disminución de NA en cerebro de gato como consecuencia de la administración de altas dosis de morfina. Los estudios posteriores que utilizaron técnicas bioquímicas fueron a menudo contradictorios (CLOUET, 1975; EIDELBERG, 1976).

Las compactas y homogéneas células del *locus coeruleus* hacen de él un buen modelo representante de núcleo central noradrenérgico para ser estudiado neurofisiológica y neurofarmacológicamente.

Los opioides inhiben la frecuencia de disparo de las neuronas del *locus coeruleus* (KORF y col. 1974; SASA y col. 1975; YOUNG y col., 1977; BIRD y KUCHAR, 1977; AGHAJANIAN, 1978). Paradójicamente, dosis agudas de morfina incrementan rápidamente las concentraciones de los principales metabolitos de la NA, 3-metoxi-4-hidroxifenetilenglicol (MHPG) y dihidroxifeniletenglicol (DHPG).

La estimulación del *locus coeruleus* produce muchos de los signos de comportamiento y fisiológicos que se encuentran en el síndrome de abstinencia en monos (REDMOND y col. 1976; REDMOND y HUANG, 1979; REDMOND y col., 1978; REDMOND, 1981).

GUNNE (1959, 1963) encontró una disminución de NA en su cerebro durante el síndrome de abstinencia que ahora parece explicarse por un aumento de la liberación.

El síndrome de abstinencia produce hiperactividad en el *locus coeruleus* de animales tolerantes como ha sido demostrado por actividad de célula unitaria (AGHAJANIAN, 1978) o por medida del turnover de NA (CRAWLEY y col., 1979; LAVERTY y ROTH, 1980; ROTH y col., 1982). Estos resultados están de acuerdo con otros anteriores en que la  $\alpha$ -metil-paratirosina (inhibidor síntesis NA) suprimía el síndrome de abstinencia en animales (CLOUET, 1975).

La clonidina, a dosis bajas, disminuye la actividad de las neuronas del *locus coeruleus* (SVENSSON y col., 1975). También inhibe la hiperactividad inducida por

naloxona en ratas tolerantes a morfina (AGHAJANIAN, 1978). Aunque tanto la clonidina como la morfina inhiben el *locus coeruleus*, ambas lo hacen en receptores independientes.

Otros antagonistas  $\alpha_2$ , tales como la lofexidina y la guanfacina también inhiben la hiperactividad que se encuentra en el *locus coeruleus* y los signos de abstinencia en ratas (ZIGUN y col., 1981).

La extensa distribución de receptores opioides apoya la idea de que no sólo el sistema noradrenérgico influye en el síndrome de abstinencia (REDMOND y KRISTAL, 1984).

## 1.2. CALCIO.

### El calcio como modulador de la función celular.

El primer investigador que observó la importancia del  $\text{Ca}^{++}$  en la regulación de la actividad celular fue Ringer en 1883, aunque no se describió su funcionamiento intracelular hasta setenta años después (KAMADA y KINOSITA, 1943; HEILBRUNN y WIERCINSKI, 1947).

Las investigaciones farmacológicas sobre el papel del  $\text{Ca}^{++}$  en el metabolismo celular comenzaron hace 20-25 años, y se ha avanzado considerablemente en su conocimiento como demuestran algunas revisiones realizadas posteriormente (EBASHI, 1980; GODFRAIND y col., 1986; CARAFOLI, 1987; MCBURNEY y NEERING, 1987; TRIGGLE, 1990; TSIEN y TSIEN, 1990).

En virtud de la obligada relación del calcio con los nucleótidos cíclicos (RASMUSSEN, 1970; RASMUSSEN y col., 1972) y con los sistemas de neurotransmisores, PHILLIS (1974) ha sugerido que el  $\text{Ca}^{++}$  puede actuar como un mensajero primario y secundario en el sistema nervioso central. El calcio activa la

triptófano hidroxilasa y la tirosina hidroxilasa, así como la adenilciclase, guanilciclase y fosfodiesterasa (KNAPP y col., 1975). El calcio es además un elemento imprescindible en los procesos de excitación-contracción (SOMLYO y SOMLYO, 1968), en los mecanismos de secreción (DOUGLAS, 1968) y en las interacciones entre los neurotransmisores y sus receptores (TRIGGLE, 1971, 1972). Su papel en la estabilización de la membrana, activación de la liberación de neurotransmisores, y su asociación con la regulación de la síntesis macromolecular (SEEMAN, 1972) lleva a reforzar la idea de su importancia en la adaptación celular. Además de que desempeña un importante papel en la constitución de la matriz ósea.

Tanto en músculo esquelético como en músculo liso el proceso contráctil es activado por iones  $\text{Ca}^{++}$ . Sin embargo, la fuente de estos es diferente según sea uno u otro tipo de músculo. El músculo esquelético posee un retículo sarcoplásmico muy extenso y desarrollado y de él procede prácticamente el 100% del  $\text{Ca}^{++}$  necesario para la contracción. Por el contrario, se puede admitir, en general, que la musculatura lisa tiene un retículo sarcoplásmico menos desarrollado que la esquelética; de ahí, que la mayor parte de los iones  $\text{Ca}^{++}$  empleados en su proceso contráctil procedan del líquido extracelular y penetren en la célula en el momento de la contracción. Así, estudios realizados por KATZ y MILEDI (1970) ponen de manifiesto, mediante técnicas de registro intracelular, que al disminuir la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular, se obtiene un claro descenso de la amplitud del potencial de acción postsináptico provocado eléctricamente. Este efecto se revierte de forma prácticamente completa al incrementar los valores de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular hasta los niveles iniciales del experimento.

VAN BREEMEN y col. (1980) explican la actividad contráctil del músculo liso como consecuencia de las variaciones de concentración del  $\text{Ca}^{++}$  intracitoplasmático. En reposo, la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  libre extracelular es, aproximadamente, de  $1.5 \times 10^{-3}$  M; en este estado no existe corriente de  $\text{Ca}^{++}$  porque la permeabilidad de la membrana para este catión es muy baja. Cuando la diferencia entre las concentraciones

intra y extracelular es mayor de  $10^4$ , se provoca un gradiente eléctrico de aproximadamente 60 mV, lo que produce un paso de  $\text{Ca}^{++}$  al interior de la célula. Los miofilamentos de músculo liso se activan con concentraciones de  $\text{Ca}^{++}$  intracitoplasmático que oscilan entre  $10^{-7}$  y  $10^{-5}$  M. La fibra muscular lisa, en contraste con la esquelética, posee dimensiones reducidas, por lo que los iones pueden difundir a todas las partes de la misma para desencadenar el proceso contráctil. El tiempo necesario para la difusión se denomina período latente y oscila normalmente entre 200 y 300 milésimas de segundo (GUYTON, 1987).

DETH y VAN BREEMEN (1977) han sugerido la posibilidad de que existan en el citoplasma celular puntos de unión con alta afinidad para el  $\text{Ca}^{++}$ , cuya activación podría estar mediada por receptores.

En resumen, la contracción muscular depende de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular libre, ya entre en el momento de la contracción (músculo liso) o se libere del retículo sarcoplásmico (músculo estriado).

La concentración de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular en el músculo liso depende del buen funcionamiento de la membrana celular. Así, en la iniciación del proceso contráctil se permite la entrada masiva de  $\text{Ca}^{++}$  y, por tanto, existe una elevación transitoria de la concentración intracelular. Existen eficaces mecanismos transportadores de membrana que extraen el  $\text{Ca}^{++}$  continuamente del interior celular.

Los mecanismos de expulsión de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular que permiten el mantenimiento de sus niveles dentro de los límites fisiológicos son (Figura 1):

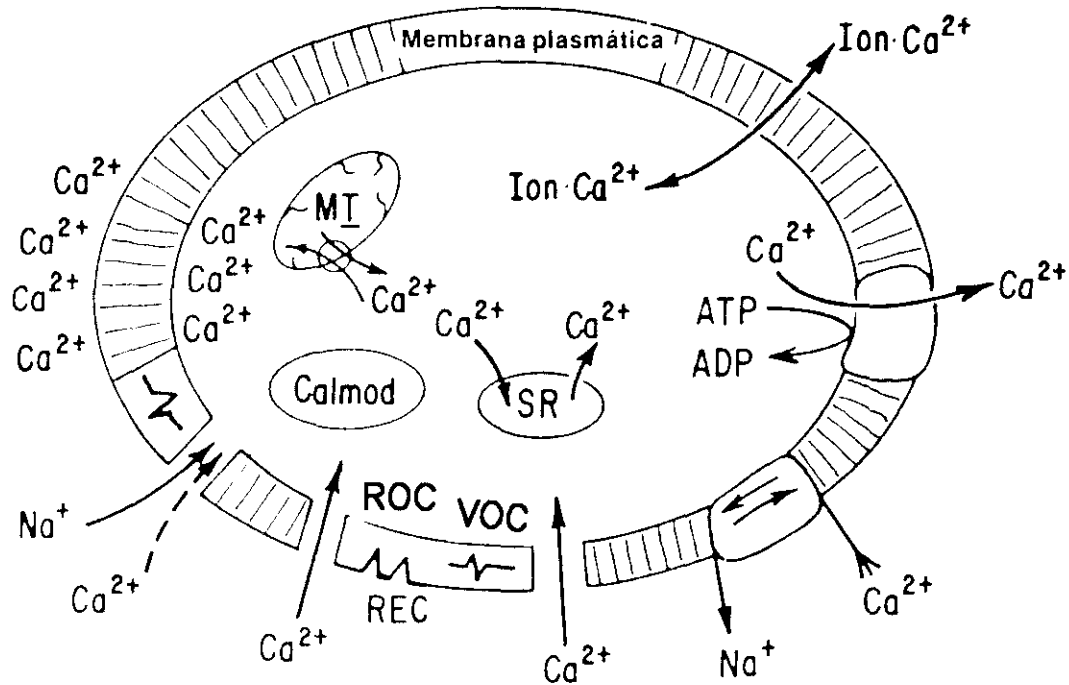
- Sistema de intercambio  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ : La salida de  $\text{Ca}^{++}$  se encuentra ligada a la entrada de  $\text{Na}^+$  gracias a la existencia de un gradiente electroquímico favorable. El intercambio se produce en proporción 3/1 a favor del  $\text{Na}^+$ . La eficacia de este sistema se encuentra ligada a la integridad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  de la membrana y se puede considerar que es menos eficaz que la bomba de  $\text{Ca}^{++}$  (MOREL y GODFRAIND, 1982, 1984).

- **Bomba de  $\text{Ca}^{++}$ :** Es el sistema más importante de expulsión de  $\text{Ca}^{++}$  que tiene la célula (GODFRAIND y col., 1976) consiste en el transporte de  $\text{Ca}^{++}$  mediado por una ATPasa dependiente de  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$ . Extrae el  $\text{Ca}^{++}$  mediante un sistema dependiente de energía (ATP) pero electroneutro, intercambiándose 2  $\text{H}^+$  por 1  $\text{Ca}^{++}$  (WUYTACK y col., 1978; WIBO y col., 1980). Su actividad se ve estimulada por la existencia del complejo  $\text{Ca}^{++}$ /calmodulina, por la proteína quinasa dependiente de AMPc y por la proteína quinasa C (MOREL y col., 1981).

En reposo, la membrana celular es prácticamente impermeable al  $\text{Ca}^{++}$  (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

Los mecanismos de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  al interior celular se resume en (Figura 1):

- **Liberación de  $\text{Ca}^{++}$  por  $\text{Ca}^{++}$ :** Este mecanismo se da sobre todo en músculo liso y consiste en un trasiego inicial de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular al interior, donde puede movilizar los depósitos de  $\text{Ca}^{++}$  intracelular que sirven para mantener el proceso de acoplamiento excitación-contracción.
- **Difusión pasiva:** Este mecanismo de entrada se basa en la existencia de un gradiente electroquímico favorable que permite el paso de  $\text{Ca}^{++}$  al interior celular a través de la membrana utilizando canales de  $\text{Na}^+$ .
- **Canales de calcio:** Se considera que el movimiento de  $\text{Ca}^{++}$  más importante desde el exterior al interior celular tiene lugar a través de canales específicos denominados **canales de calcio** (FLOREZ, 1980).



*Figura 1.* Representación gráfica de los procesos que controlan los movimientos celulares del calcio. La entrada de calcio puede tener lugar a través de canales iónicos, incluyendo el canal rápido de sodio (un componente de menor importancia) y a través de canales de calcio dependientes de voltaje (VOC) y operados por receptor (ROC). Además, la entrada de calcio puede darse como un componente del proceso de intercambio plasmalémico sodio-calcio que puede operar en ambas direcciones. El bombeo de calcio está mediado por una ATPasa de calcio; el secuestro de calcio (y su liberación) puede tener lugar en varios orgánulos, incluyendo las mitocondrias (MI), el retículo sarcoplásmico (RS) y la superficie interna de la membrana plasmática. Un proceso de entrada no fisiológico está representado por el transporte ionóforo ( $\text{Ion} \cdot \text{Ca}^{2+}$ ).

La capacidad del  $\text{Ca}^{++}$  para servir como mensajero intracelular depende de que el incremento de  $\text{Ca}^{++}$  citosólico libre sea reconocido como una señal para iniciar la

función celular. La alta afinidad de la troponina C, calmodulina y miosina, por el  $\text{Ca}^{++}$  sirven para esta función. Una vez consumada la unión  $\text{Ca}^{++}$ -proteína específica, el complejo formado activa la respuesta celular específica, ya sea contracción, en células musculares, secreción y exocitosis en células ecrinas o conducción de impulsos en células nerviosas.

### Canales de calcio.

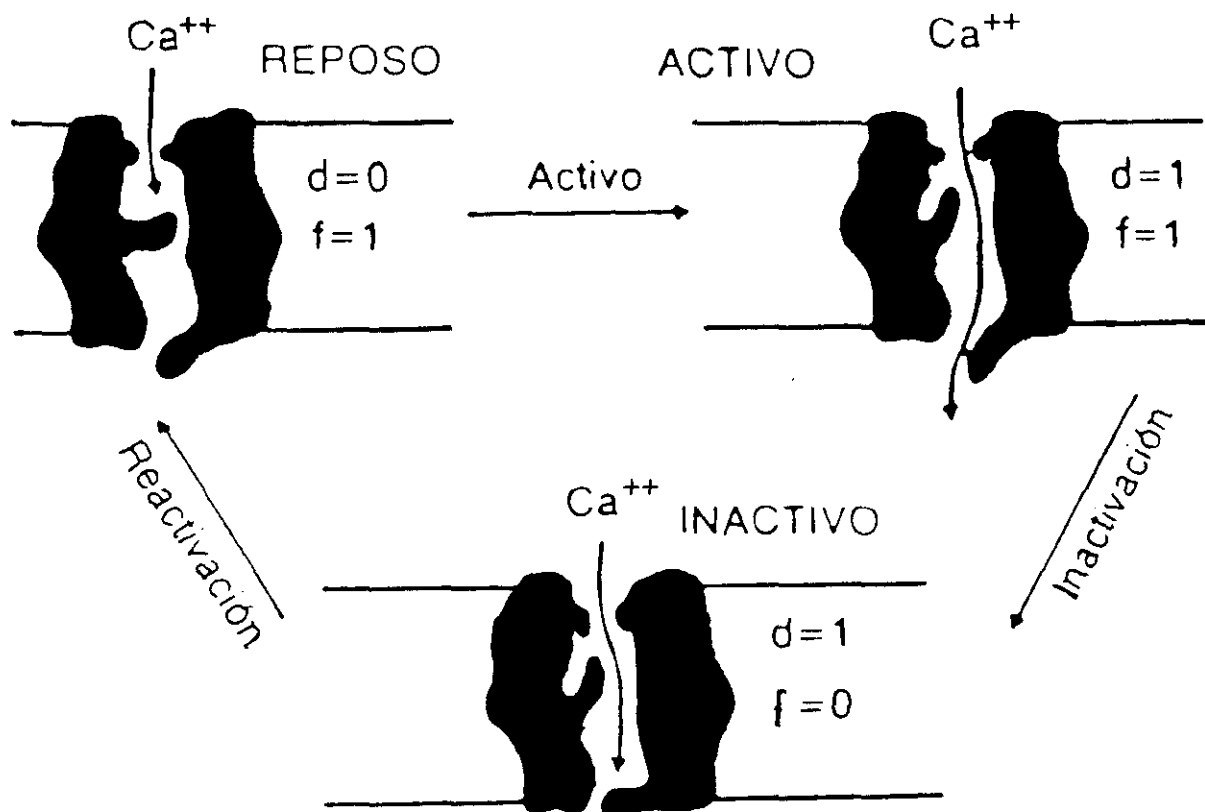
Los canales de calcio son estructuras proteicas transmembranares que tras diferentes estímulos permiten el paso de  $\text{Ca}^{++}$  al interior de la célula a través de un poro que dejan en su interior (HAGIWARA, 1973; REUTER, 1973; BAKER y GLITISCH, 1975).

SANGUINETTI y KASS (1984) propusieron, por analogía con los canales de  $\text{Na}^+$ , que el canal de  $\text{Ca}^{++}$  puede encontrarse en tres estados diferentes:

- Reposo: La conductancia de canal es mínima porque la compuerta de activación está cerrada.
- Activo: La activación se produce por el potencial de acción que provoca un aumento breve de la permeabilidad por apertura rápida de las compuertas.
- Inactivo: Aparece inmediatamente después de estado activo y se produce por el cierre de la compuerta de inactivación.

Una vez inactivado, el canal debe pasar al estado de reposo para poder ser activado de nuevo, lo que se denomina reactivación del canal (TAMARGO y VALENZUELA, 1987) (Figura 2).





*Figura 2.* Representación esquemática del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  en los tres estados que puede presentar: reposo, activo e inactivo; d: compuerta de activación; f: compuerta de inactivación; 0: cerrado; 1: abierto. (Tomado de TAMARGO y VALENZUELA, 1987).

El  $\text{Ca}^{2+}$  puede entrar en la célula a través de dos tipos de canales específicos (BOLTON, 1979):

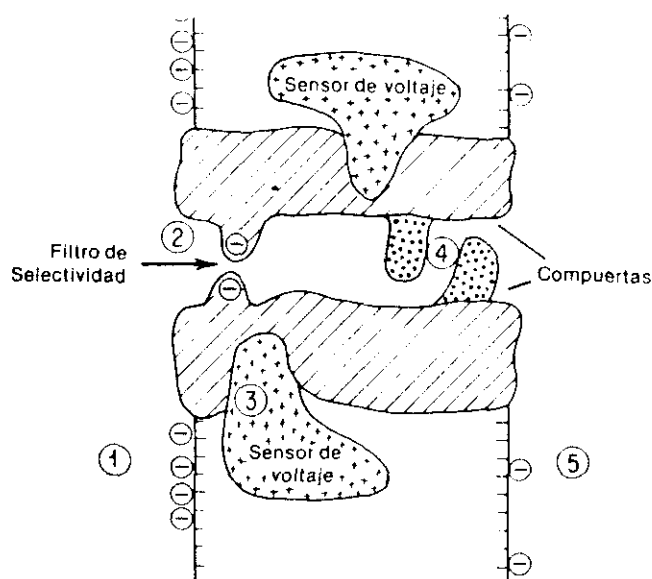
- canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje-dependientes (VOC).
- canales de  $\text{Ca}^{2+}$  receptor-dependientes (ROC).

Los canales tipo VOC funcionan por un sensor de voltaje que es modulado por las variaciones del potencial transmembrana (Figura 3). Además del  $\text{Ca}^{2+}$ , otros

cationes ( $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$ ,  $\text{Na}^+$ ) pueden atravesarlos o unirse a ellos aunque existe un filtro de selectividad que determina diferentes grados de permeabilidad según la especie, siendo el orden de permeabilidad para cobayo  $\text{Mg}^{++} < \text{Ba}^{++} < \text{Sr}^{++} < \text{Ca}^{++} < \text{Cd}^{++}$  (LANSMAN y col., 1986); y para músculo esquelético de rana  $\text{Mg}^{++} < \text{Mn}^{++} < \text{Ca}^{++} < \text{Sr}^{++} < \text{Ba}^{++}$  (RUFF, 1986).

El lugar de unión de los cationes divalentes no permeables ( $\text{Cd}^{++}$  y  $\text{Ba}^{++}$ ) se encuentra en la cara externa del canal, impidiendo la entrada de otros cationes cuando estos ocupan el canal (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

Los iones  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{La}^{3+}$  actúan bloqueando el canal de calcio. De todos ellos el más potente y de acción más duradera es el  $\text{La}^{3+}$  (STANFIELD, 1986; RUFF, 1986).



*Figura 3.* Representación esquemática de un canal de calcio tipo VOC. Las zonas cargadas negativamente sobre la superficie externa (1) e interna (5) de la membrana sirven de sitio de unión a cationes divalentes fundamentalmente; 2: filtro de selectividad; 3: sensor de voltaje; 4: compuertas que determinan el estado de reposo, abierto o cerrado del canal.

Se han encontrado diferentes corrientes de calcio según el tipo de célula estudiada, lo que ha dado lugar a varias conformaciones de los canales VOC:

● HESS y col. (1984) y KOKUBUN y REUTER (1984) describieron los siguientes:

- Tipo 0. Permanece cerrado y no presenta aperturas.
- Tipo 1. Se caracteriza por permanecer cerrado la mayor parte del tiempo con presentación de aperturas de breve duración
- Tipo 2. Permanece abierto con presentación de cierres de breve duración.

● NOWYCKY y col. (1985), NILIUS y col. (1985) y SIEKEVITZ y col. (1985) propuganaron este otro tipo de subclasificación de los VOC:

- Tipo L. Debe su nombre a la expresión *long lasting* por producir una corriente de larga duración. Se ha aislado en corazón, músculo liso y neuronas. Está compuesto por cinco polipéptidos ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_2$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ).
- Tipo T. Debe su nombre a la expresión *transient*. Se activa por depolarizaciones lentas y suaves y se inactiva rápidamente. Se aisló primeramente en células de ganglios de raíz dorsal. Tiene una estructura similar al canal L, pero con mínimas alteraciones en la secuencia de aminoácidos de la subunidad  $\alpha_1$  (SHEARMAN, 1989).
- Tipo N. Inicialmente significaba "no L, no T", aunque actualmente debe su nomenclatura a su localización neuronal. Para su activación requieren un potencial de membrana muy negativo y una gran depolarización presináptica. Se inactivan de manera relativamente rápida (YAARY y col., 1987; SPEDDING, 1987).

En la Tabla 1 se muestra un resumen de las características de cada uno de los subtipos de canal VOC. Los distintos tipos de canales tienen un comportamiento diferente como respuesta a las diversas toxinas con que se pueden tratar, lo cual sirve

para su diferenciación. Gracias a la toxina FTX procedente del veneno de una araña (*funnel web spider*), se ha conseguido determinar la existencia de un nuevo canal de calcio denominado tipo P (LLINAS y col., 1989).

Los canales tipo ROC están constituidos por un poro delimitado por proteínas transmembrana insertadas en la bicapa lipídica de la membrana celular. Sin embargo, no está claro si el canal forma parte de la estructura de cada receptor o si existe un sólo tipo de canal que se activaría por varios receptores acoplados al mismo (ARTALEJO y GARCIA, 1986).

El concepto general sobre el funcionamiento de los canales de calcio tipo ROC es que la estimulación de un receptor, tras el acoplamiento de un ligando provoca una respuesta que depende de la concentración de  $\text{Ca}^{++}$  extracelular y que consiste en activar el canal (GODFRAIND y col., 1986).

Diversos autores han descrito más de un neurotransmisor capaz de activar los canales tipo ROC, así por ejemplo y entre otros, se demuestra la existencia de unos canales activados por 5-hidroxitriptamina y otros por acetilcolina en arteria coronaria bovina (RATZ y FLAIM, 1985) y en aorta de conejo (FLAIM y col., 1985).

TABLA 1. Características de los subtipos de canales de  $\text{Ca}^{++}$  VOC.

	L	T	N	P
conductancia	20-25 pS	7-8 pS	13 pS	10-12 pS
activación	-10 mV	-50 mV	-	-
pico	+20 mV	-10 mV	-	-
inactivación	lenta incompleta	rápida completa	rápida	incompleta
permeabilidad	$\text{Ba}^{++} > \text{Sr}^{++} > \text{Ca}^{++}$	$\text{Ca}^{++} = \text{Sr}^{++} = \text{Ba}^{++}$	$\text{Ba}^{++} > \text{Ca}^{++}$	-
estabilidad	lábil	estable	-	-
agonista	BAY K 8644 CGP 28392	-	-	-
antagonistas orgánicos	1,4-DHP $\omega$ -CgTx	$\omega$ -CgTx	$\omega$ -CgTx	FTX
antagonistas inorgánicos	Cd (20 $\mu$ M)	Cd > 200 $\mu$ M Ni 0.1mM	Cd 20 $\mu$ M	-

$\omega$ -CgTx:  $\omega$ -conotoxina; FTX: toxina de veneno de araña.

(Diseñada a partir de NOWYCKY y col., 1985; McCLESKEY y col., 1986; HOFMANN y col., 1987; WAGNER y col., 1987; SHEARMAN y col., 1989; TSIEN y TSIEN, 1990.

#### Fármacos antagonistas del calcio.

##### **Definición.**

El término antagonista de calcio fue introducido simultáneamente por dos autores al final de la década de los 60. Godfraind (GODFRAIND y KABA, 1969a,b) introdujo este concepto trabajando en músculo liso vascular, y Fleckenstein (FLECKENSTEIN y col., 1967, 1969) lo hizo trabajando en músculo cardíaco. Este último autor estableció que un fármaco antagonista de  $\text{Ca}^{++}$  es aquel que inhibe la corriente

lenta de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  al interior celular de una manera dosis-dependiente y cuyo efecto deber ser reversible por iones  $\text{Ca}^{++}$ . Posteriormente VAN ZWIETEN (1985) propuso la siguiente definición: "Los bloqueadores de la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  son compuestos cuyo mayor efecto es la inhibición selectiva del flujo lento de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  que atraviesa la membrana celular por un canal apropiado en condiciones fisiológicas. El efecto debe ser reversible por  $\text{Ca}^{++}$ ".

Sin embargo, etimológicamente el término antagonista de calcio no era el más preciso para los fármacos que cumplían estos requisitos, y a lo largo de la década de los 70 se introducen nuevas denominaciones como la de: **bloqueantes de la entrada de calcio** (GODFRAIND, 1981); **bloqueantes de los canales lentos de calcio** (NAYLER y POOLEWILSON, 1981; BOU y col., 1983), aunque, tal vez, la denominación que más se ha generalizado ha sido la de **antagonistas de calcio** (ACa). Por este motivo la OMS recomendó en 1985 el uso de este último término (VANHOUTTE y PAOLETTI, 1987; PAOLETTI y GOVONI, 1987).

### **Clasificación.**

Desde un punto de vista químico, los antagonistas de calcio forman un grupo muy heterogéneo, hasta el punto de que no ha sido posible realizar una clasificación satisfactoria basándose en su estructura química. Existen actualmente muchas clasificaciones

según los diferentes autores que se basan en la estructura química de los ACa o en su selectividad (FLECKENSTEIN, 1981; KAUFMANN y col, 1982; SPEDDING, 1982; SPEDDING y CAVERO, 1984; GODFRAIND y col., 1986; GODFRAIND, 1987). En 1987, la OMS ha clasificado los ACa en dos grupos (Tabla 2).

TABLA 2. Clasificación de los antagonistas de calcio.

*Antagonistas del calcio selectivos*

GRUPO I, Fenilalquilaminas: verapamilo, galopamilo (D 600); en investigación: anipamilo, desmetoxiverapamilo (D 888), emopamilo, falipamilo (AQ-A-39), ronipamilo.

GRUPO II, Dihidropiridinas: nicardipino, nifedipino, nilodipino, nimodipino, nisoldipino, nitrendipino, ryosidino; en investigación: amlodipino, azodipino, dazodipino, felodipino, flordipino, iodipino, isradipino, mesudipino, ni(1)vadipino, oxidipino, riodipino, FR 7534, FR 34235, PN 200-110.

GRUPO III, Benzotiazepinas: diltiazem; en investigación: fostedilo (KB-944).

*Antagonistas de calcio no selectivos*

GRUPO IV, Difenilpiperazinas: cinarizino, flunarizino.

GRUPO V: prenilamina, fendilina, terodilina.

GRUPO VI (otros): bepridil, caroverina, etafenona, perhexilina.

(Tomada de VANHOUTTE, 1987).

En esta Tesis Doctoral se han utilizado dos antagonistas de calcio de diferentes grupos químicos: El nimodipino (BAY E 9736, 1,4-dihidro-2,6-dimetil-4-(3-nitrofenil)-3,5-piridina-ácido dicarboxílico-isopropil-(2-metoxi-etil)-éster) (Figura 5), del grupo de las dihidropiridinas (DHP) y el diltiazem (d-cis-3-acetoxi-5-(2-(dimetilamino)-etil)-2,3-dihidro-2-(4-metoxifenil)-1,5-benzotiazepin-4(5H)) (Figura 6), del grupo de las benzotiazepinas.

**Mecanismo de acción.**

Ciertos derivados del difenilmetilo, de los que la flunarizina es el representante mejor conocido, poseen una débil actividad antagonista de  $\text{Ca}^{++}$  en condiciones

fisiológicas (WAUQUIER, 1982; TRIGGLE y SWAMY, 1983), mientras que son muy eficaces y potentes inhibidores de la sobrecarga masiva de  $\text{Ca}^{++}$  que se produce en determinadas situaciones patológicas, tales como es el caso de la isquemia.

Sabemos que los antagonistas de calcio dihidropiridínicos actúan sobre canales de tipo L (NILIUS y col., 1985; NOWYCKY y col., 1985; HIRNING y col., 1988). También sabemos que la inactivación de los canales VOC sucede por dos mecanismos, depolarización y/o acumulación de  $\text{Ca}^{++}$  en el extremo citoplasmático del canal (ECKERT y CHAD. 1984; GREENBERG y col., 1985).

Ya se ha descrito anteriormente, que el canal de  $\text{Ca}^{++}$  puede encontrarse en tres estados diferentes: reposo (R), activado (A) e inactivado (I) (SANGUINETTI y KAS, 1984). Tanto las DHP como el diltiazem tienen mayor afinidad por el estado (I) del canal (KANAYA y col., 1983; HESS y col., 1984).

Las DHP tardan un tiempo en unirse al canal de  $\text{Ca}^{++}$ , por ello en aquellos tejidos donde el canal tiene un ciclo más breve, permaneciendo menos tiempo en estado inactivo, las DHP no se pueden unir. Es por esto que, dicho grupo de antagonistas de calcio tiene un efecto cardíaco menos marcado que el efecto vascular (BEAN y col., 1987). El nimodipino tiene acciones preferentemente cerebrovasculares (KAZDA y TOWART, 1982) así como neuro y psicofarmacológicas (HOFFMEISTER y col., 1982).

Empleando la técnica del parche de membrana y analizando registros de canal único, que permite conocer el tipo de modulación que estos fármacos ejercen sobre la cinética del canal de calcio, se ha demostrado que todos los antagonistas de calcio inhiben la corriente de  $\text{Ca}^{++}$ , lo cual podría atribuirse a que disminuyen el número de canales de calcio de la membrana o la amplitud de la de la corriente de calcio ( $I_{\text{Ca}}$ ) y/o a que reducen la probabilidad de apertura del canal. Hasta la fecha no se ha demostrado que los antagonistas de calcio modifiquen el número de canales o la amplitud de la  $I_{\text{Ca}}$ . Sin embargo, sí acortan el tiempo de apertura y prolongan el tiempo



que los canales permanecen en estado inactivo, es decir, que los antagonistas de calcio reducen la probabilidad de que el canal se abra (TRAUTWEIN y CAVALIE, 1985).

Sin embargo, existen importantes diferencias en la forma en que los antagonistas inhiben la corriente de calcio. Verapamilo y diltiazem están ionizados a pH fisiológico, por lo que para alcanzar su receptor en la superficie citosólica del canal deben atravesar la membrana en su forma no cargada, y una vez en el citoplasma la forma cargada alcanzaría su receptor. Por el contrario, las DHP, que no están cargadas a pH fisiológico, alcanzan su supuesto receptor en la superficie externa del canal directamente (HONDEGHEM y KATZUNG, 1984; HESS y col., 1984)

Las DHP se unen en un punto de la membrana asociado a los canales de  $\text{Ca}^{++}$ . Esta unión es saturable y se puede interferir de manera competitiva por otras DHP, difenilalquilaminas y por inhibidores de la calmodulina (GLOSSMANN y col., 1982). El estudio de los puntos de unión de alta afinidad se mejoró con la realización de experimentos con DHP marcadas ( $\text{DHP-}[^3\text{H}]$ ). Se ha descrito también un lugar de unión de baja afinidad para el nitrendipino- $[^3\text{H}]$ , concretamente en corazón (BELLEMAN y col., 1981; VAGHY y col., 1984a,b) arterias (C.R. TRIGGLE y col., 1982) y cultivos de miocitos cardíacos (MARSCH y col., 1983).

Trabajos más recientes recogen la existencia de un punto de unión para nimodipino- $[^3\text{H}]$  en glóbulo rojo humano con unas características muy particulares (relativamente baja afinidad y estéreo selectividad inversa al punto de unión clásico de las DHP (STRIESSNIG y col., 1985a, b). El punto de unión de las DHP difiere en su localización en función del tipo de célula del que se trate. Así, en células de músculo liso la localización de los puntos de unión específicos para estos fármacos se encuentran íntimamente ligados a la membrana plasmática (GROVER y col., 1984; GODFRAIND y WIBO, 1985). En células de músculo esquelético, se encuentran en los túbulos T (FOSSET y col., 1983; BRANDT, 1985). Y en tejido cardíaco en el sarcolema (BRANDT, 1985).

También se ha estudiado el punto de unión para diltiazem utilizando d-cis-diltiazem tritiado (SCHOEMAKER y LANGER, 1985).

Mediante estudios autorradiográficos se ha encontrado que los puntos de unión en SNC para los antagonistas de calcio tienen una distribución preferencial por las sinapsis (MURPHY y col., 1982).

MARANGOS y col. (1982) han descrito la distribución regional de los puntos de unión de DHP en el cerebro, de forma, que, hipocampo, núcleo caudado y corteza presentan una densidad de dos a cinco veces mayor que hipotálamo, cerebelo y tronco cerebral.

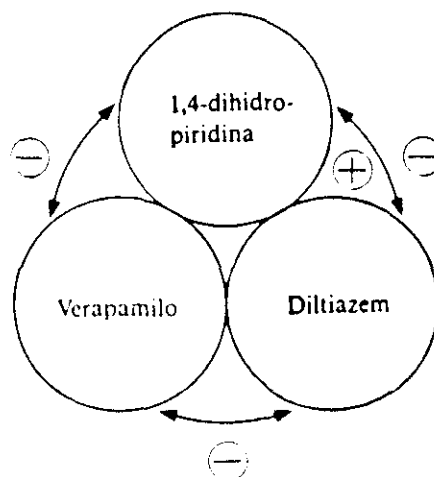
Más recientemente, se ha descrito que el punto de unión de las DHP está relacionado con un lugar clave del canal de  $\text{Ca}^{++}$  tipo L, probablemente, un sensor de voltaje (BRUM y RIOS, 1986).

El acoplamiento de las DHP en su punto de unión depende de la presencia de cationes divalentes, incluyendo el  $\text{Ca}^{++}$  (GOULD y col., 1982; TRIGGLE y JANIS, 1984; GLOSMANN y FERRY, 1985), lo que puede sugerir que dicho punto de unión esté engarzado a un lugar de interacción catiónica asociada con la función del canal (TRIGGLE, 1988). Una vez que la DHP se acopla en su punto de unión induce la fosforilación de una proteína de 32000 Da que forma parte del mismo punto de unión (HORNE y col., 1984).

El punto de unión parece estar constituido por una glicoproteína (CURTIS y CATERALL, 1984), que probablemente está engarzada alostéricamente a puntos de unión para otras clases estructurales de ligandos de canales de  $\text{Ca}^{++}$  (TRIGGLE, 1988). esta idea concuerda con el modelo propuesto por GLOSSMANN y col. (1985) (Figura 4).

⊕ : potenciación

⊖ : inhibición



*Figura 4.* Modelo de los puntos de unión para 1,4-dihidropiridinas, verapamilo y diltiazem. Las flechas simbolizan las interacciones alostéricas.

### Farmacocinética.

#### ● NIMODIPINO.

La absorción de las DHP es muy rápida tras su administración oral cuando se administran en solución con agua y disolventes orgánicos (polietilenglicol, etanol o cremophor), llegando a alcanzar cifras del 90% (RÄMSCH y col., 1986; AHR y col., 1987). Alcanza la concentración plasmática máxima al cabo de 20-45 minutos.

Se une a proteínas en un 98%, principalmente a la albumina y a la  $\alpha$ -glucoproteína ácida.

Los antagonistas de calcio sufren un intenso metabolismo hepático dando metabolitos inactivos en el caso de las DHP (BAARNHEILM y HANSSON, 1986; SCHERLING y col., 1987) (Figura 5). Dicho metabolismo hace que tengan vidas medias muy cortas, siendo la del nimodipino de 2.7 horas. La biodisponibilidad es en general muy baja (5-10 %), probablemente debido a que sufre un intenso efecto de primer paso hepático (KLEINBLOESEM y col., 1984; RÄMSCH y col., 1986; VAN HARTEM y col.,

1987). El volumen de distribución de los antagonistas de calcio es muy alto, lo que revela una amplia distribución hística. Para el nimodipino el valor del volumen de distribución es de 1.9 l/kg.

El carácter lipofílico de las DHP les confiere relativa facilidad a la hora de atravesar barreras orgánicas; es notable la facilidad y rapidez con que el nimodipino atraviesa la barrera hematoencefálica (VAN DER KERKHOFF y DREWES, 1989), lo que le confiere una proyección clínica diferente del resto de las dihidropiridinas.

La eliminación ocurre principalmente por vía renal. En la orina no se detectan DHP en forma activa, o si se detectan, es en cantidades despreciables (MEYER y col., 1983a,b; RÄMSCH y col., 1986; AHR y col., 1987; SCHERLING y col., 1987). La cantidad de metabolitos que aparecen en la orina depende de cada DHP, siendo para el caso del nimodipino de un 15%.

#### ● DILTIAZEM.

La absorción oral es buena disuelto en agua. Se distribuye rápidamente a todos los tejidos, incluso puede atravesar la barrera hematoencefálica. Sus efectos aparecen al cabo de 15-30 minutos, obteniéndose los niveles plasmáticos máximos al cabo de 1-2 horas. Se une a proteínas en un (80%), valor algo inferior que el del nimodipino.

El diltiazem también sufre un efecto de primer paso importante y se metaboliza por desacetilación, N-demetilación, O-demetilación y conjugación; dando metabolitos activos, de entre los cuales, se puede destacar el desacetildiltiazem, que tiene mayor potencia antagonista del calcio que el diltiazem (Figura 5).

La vida media del diltiazem es de 4-6 horas, siendo algo mayor para el desacetildiltiazem.

La eliminación del diltiazem ocurre en un 65% por vía biliar, y se produce recirculación enterohepática.

Los metabolitos del diltiazem aparecen en la orina en un 35%; pero los valores encontrados para el diltiazem son inferiores al 0.1 % (CHIBATA, I., 1988; OPIE, L., 1989).

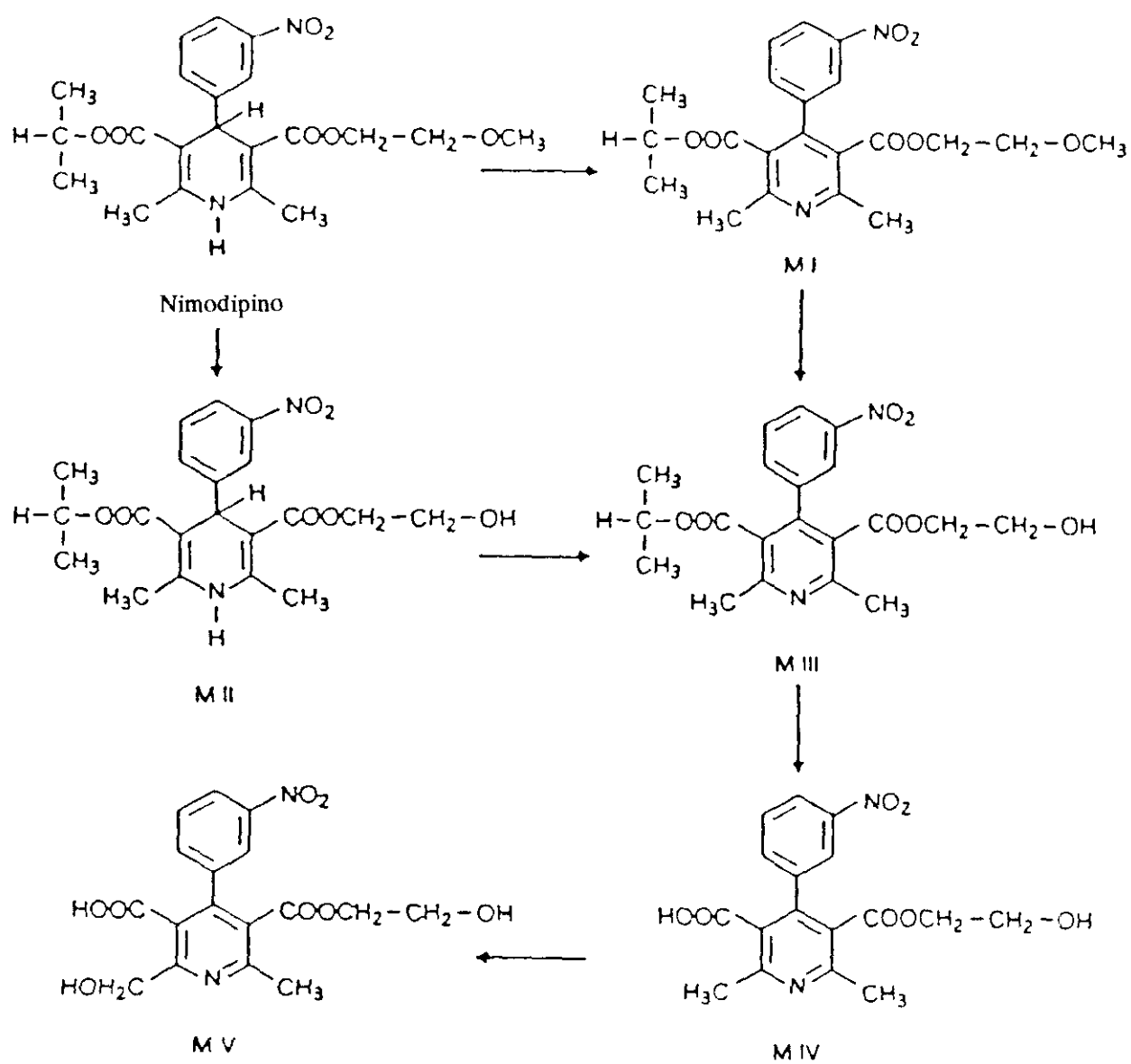
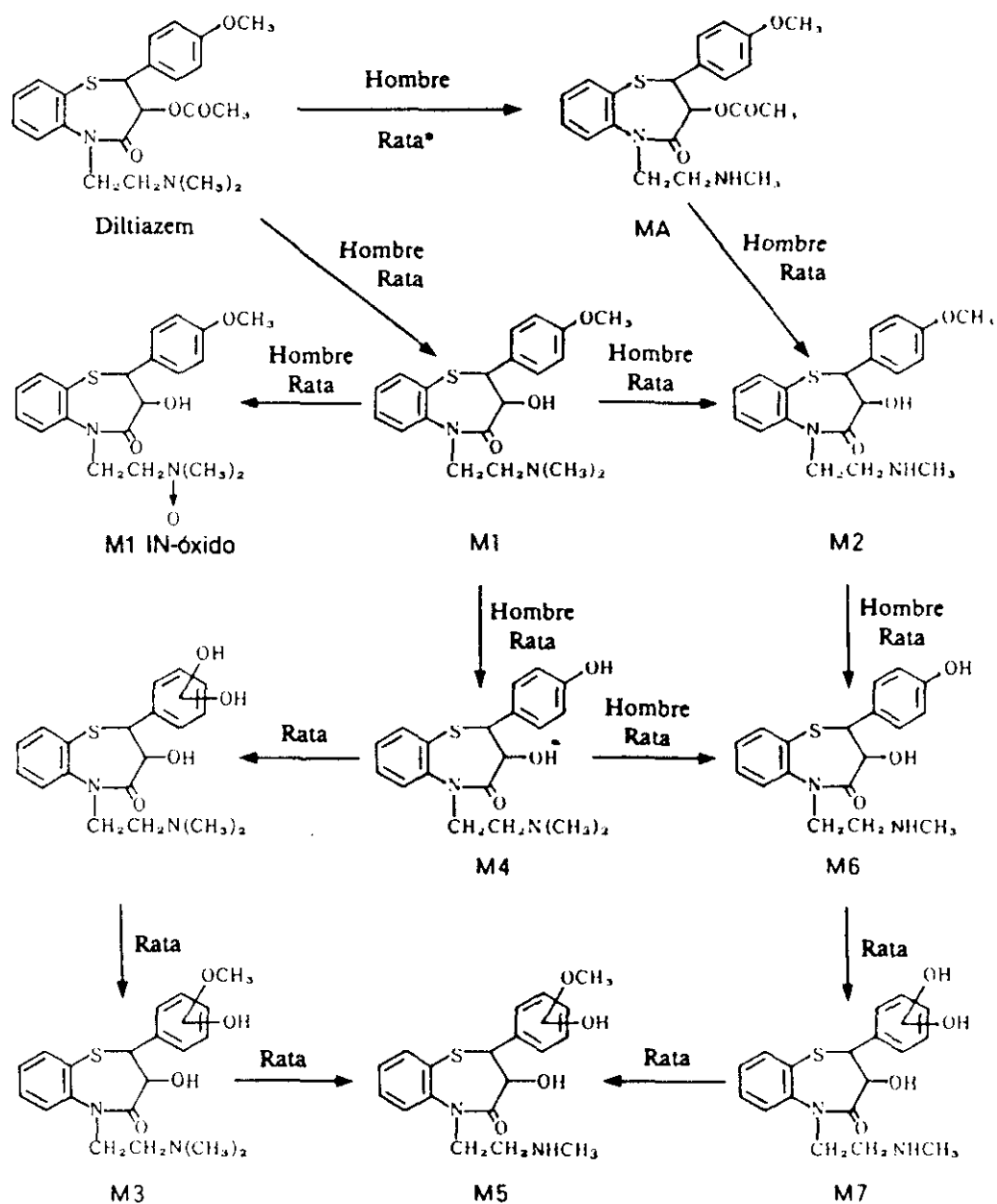


Figura 5. Ruta metabólica principal del nimodipino y sus metabolitos más importantes.



\* : El MA ha sido hallado recientemente en las ratas.

**Figura 6.** Vías metabólicas del diltiazem en la rata y en el hombre.

### Relación de los antagonistas de calcio con los alfa-adrenoceptores.

En cierto sentido podría entenderse que los antagonistas irreversibles alfa-adrenérgicos actúan reproduciendo los efectos de los antagonistas de calcio, ya que son capaces de inhibir las contracciones provocadas por depolarización inducida por  $K^+$  en aorta de conejo (SHIBATA y CARRIER, 1967) y en *taenia coli* de cobayo (SHIBATA y col., 1968), lo que sugeriría que son capaces de inhibir la depolarización provocada por entrada de  $Ca^{++}$  extracelular en el músculo liso. La fenoxibenzamina (antagonista  $\alpha$ -adrenérgico irreversible) bloquea la unión de nitrendipino- $[^3H]$  con su receptor por disminuir la  $K_d$  sin afectar la  $B_{max}$ , probablemente por un efecto alostérico (GENGO y col., 1984).

Por otra parte, algunos antagonistas de calcio (nicardipino y gallopamilo) interactúan con receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos y desplazan a sus ligandos específicos (PLOTTER y ATLAS, 1983). Estos hechos han llevado a la hipótesis de que puede existir algún tipo de interacción entre receptores  $\alpha$ -adrenérgicos y canales de  $Ca^{++}$ , y se ha planteado la posibilidad de que ambas estructuras se solapen en la membrana celular de tal forma que un cambio en la configuración de una afecte a la otra (GODFRAIND y col., 1986).

## **1.3. CALCIO Y OPIACEOS.**

### Calcio y acciones agudas de los opiáceos.

El calcio ha sido implicado en numerosas acciones de los opiáceos (CHAPMAN y WAY, 1980).

KAKUNAGA y col. (1966) encontraron que la inyección intracisternal de calcio, pero no de otros iones divalentes, antagonizaba la analgesia inducida por opiáceos.

Este hecho fue confirmado por HARRIS y col. (1975) quienes demostraron que el antagonismo de la analgesia opiácea que presentaba el calcio era sensible al EGTA (etilen-glicol-( $\beta$ -aminoetileter)-tetraacetato) pero no al EDTA (etilen-diamino-tetraacetato).

El lantano, un conocido antagonista de calcio, parecía tener un sitio de acción neuroanatómico similar al de la morfina en la producción de analgesia ya que de hecho podía sustituir a la morfina porque presenta tolerancia cruzada (HARRIS y col., 1975; HARRIS y col., 1976).

Fueron estos estudios los que dieron soporte a la idea de que la analgesia producida por la morfina podría deberse a la modificación de los flujos de calcio por los opioides (SHIKIMI y col., 1967).

SHIKIMI y col. (1971) demostraron que la administración aguda de morfina disminuía el contenido de calcio en cerebro de ratón, y los estudios de ROSS y col. (1974), pusieron de manifiesto que esta disminución era dosis dependiente. Las medidas del calcio han mostrado que no existe un área predominante en el cerebro donde la *disminución de calcio sea mayor*, es por esto que *la relación entre el calcio y los opiáceos no sigue ningún patrón determinado* y por ende, su relación con los sistemas de neurotransmisores no muestra especificidad alguna (CARDENAS y ROSS, 1975). KUHAR y col. (1973) encontraron también esta falta de correlación produciendo lesiones en determinadas zonas ricas en un neurotransmisor.

Aunque la reserpina disminuye los niveles de calcio, siendo el efecto aditivo cuando se emplea juntamente con morfina, el mecanismo por el que producen este efecto es diferente, ya que el pretratamiento con reserpina no modifica el desarrollo de tolerancia a la disminución del calcio (ROSS, 1975; ROSS y LYNN, 1975). Además, el hecho de que la naloxona revierta la disminución de calcio de forma específica para la morfina y no para otro tipo de sustancias como la reserpina o el pentobarbital hace pensar en una relación más directa entre el calcio y los efectos opiáceos (ROSS y col., 1976).



HUIDOBRO-TORO y col. (1981) encontraron una disminución de la potencia de la normorfina en ileon incubado con una concentración elevada de  $\text{Ca}^{++}$ . Por otro lado, la disminución de la concentración externa de  $\text{Ca}^{++}$  aumentó el efecto inhibitorio del DAMGO (DOUGALL y LEFF, 1987).

La dinorfina A (agonista endógeno del receptor  $\kappa$ ) produce una disminución de la entrada de  $\text{Ca}^{45}$  en los sinaptosomas que es antagonizada por un antagonista específico de dichos receptores, la nor-binaltorfimina (WANG y col., 1990). El descubrimiento de ligandos más selectivos para el receptor  $\kappa$  (U-50488H) ha dado como resultado una disminución de calcio intracelular de forma más pronunciada que los la dinorfina A. Posiblemenete por un aumento de la salida de  $\text{Ca}^{++}$  (OLSON y WELCH, 1991).

MORITA y NORTH (1982), mediante estudios electrofisiológicos, han encontrado que la hiperpolarización producida por agonistas  $\mu$  en las neuronas mientéricas de tipo S aumentaba con la disminución del  $\text{Ca}^{++}$  extracelular y ocurría lo contrario con el aumento. Y muy recientemente SCHROEDER y col. (1991) han encontrado que la activación del receptor  $\mu$  bloquea canales de calcio en neuronas sensoriales de rata. Suprimiendo las corrientes tanto de bajo umbral (relacionadas con los canales tipo T) como las de alto umbral.

SALTO y col. (1990) han encontrado que la inhibición en la liberación de ACh y ATP producida por el tratamiento con morfina y encefalinas impide la reorganización de las partículas intramembranares de la membrana presináptica y la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  en los sinaptosomas inducida por un estímulo depolarizante con  $\text{K}^+$ .

#### Relación entre tolerancia, dependencia y calcio.

Actualmente se están empleando métodos de liberación continua de opiáceos

mediante minibombas osmóticas para estudiar los fenómenos de tolerancia. Según esta técnica, ratas tratadas con fentanilo durante siete días desarrollan tolerancia al efecto del opiáceo. Esta tolerancia es abolida por el empleo del antagonista de calcio nimodipino (DIERSSEN y col., 1990).

Se ha descrito que varios factores que pueden modificar la tolerancia y la dependencia a los opioides. De entre ellos, hay que considerar los relacionados con los ácidos nucleicos y con la síntesis de proteínas. La cicloheximida y la puomicina, inhibidores de la síntesis de proteínas, alteran la tolerancia a la analgesia (COX y OSMAN, 1970). También encontraron tolerancia a la deplección de calcio SHIKIMI y col. (1971) y ROSS (1975), quienes demostraron que la cicloheximida pero no el cloramfenicol bloquea la tolerancia a la pérdida de calcio. La cicloheximida tiene un sitio de acción directamente relacionado con la interrupción de la síntesis de membranas nerviosas (MORGAN y AUSTIN, 1968; BARONDES, 1974), mientras que el cloramfenicol está relacionado con la síntesis de mitocondrias. Según estos resultados, la rápida tolerancia a la pérdida de calcio se puede explicar por cambios en la síntesis de las proteínas de la membrana neuronal.

#### Estudios subcelulares.

Una vez demostrados los efectos depleccionantes del calcio por los opioides, vamos a estudiar en que parte de la célula ocurre exactamente esta pérdida y si está relacionada con la unión de los agonistas opioides. Considerando la deplección de calcio como un efecto típicamente opioide, se podría esperar que los niveles de calcio se alteren preferentemente en aquellos lugares donde se unan los opioides.

PERT y SNYDER (1973b) encontraron que los opioides marcados con tritio se unían predominantemente *in vitro* a la fracción mitocondrial contenida en los terminales

nerviosos.

Experiencias posteriores, en las que se administraron ligandos opioides marcados radiactivamente, *in vivo*, han demostrado la asociación de estos con la fracción sináptica (CLOUET y WILLIAMS, 1973; MULE y col., 1974).

Pero siguen apareciendo resultados controvertidos que demuestran la existencia de una nueva clase funcional de receptores opioides acoplados a la estimulación de la adenilato ciclasa por un mecanismo de transducción independiente de calcio (ONALI y OLIANAS, 1991).

Además del calcio, se sabe que otros cationes juegan un papel en las membranas celulares y son cofactores de varias enzimas (WILLIAMS, 1970; MADIERA y ANTUNES-MADIERA, 1973). Aún así, KAKUNAGA y col. (1966), no fueron capaces de antagonizar la analgesia opioide con inyecciones intracisternales de magnesio. Recientemente se ha demostrado que tanto el calcio como el magnesio pueden inhibir la unión de opioides a las fracciones de membrana. En esta línea, el sodio y el manganeso se han mostrado eficaces, *in vitro*, en la modulación de la unión de opioides (SIMON y col., 1973; PERT y SNYDER, 1974; PASTERNAK y col., 1975; SIMON y col., 1975).

Es difícil por el momento decidir si algún catión, además del calcio, estará implicado en la regulación de la conformación de los receptores opioides. LEE y col. (1975) postularon que la existencia de una combinación de cationes mono y divalentes contribuye a la afinidad y accesibilidad de los sitios de unión para los opioides. La hipótesis de CARDENAS y ROSS (1976) postula que la unión de la morfina induce un desplazamiento del calcio de la membrana como si el receptor estuviera asociado al calcio en una conformación especial. Efecto que es revertido por la naloxona (ROSS y col., 1976).

La administración conjunta de clonidina y el agonista selectivo del receptor  $\kappa$  U-

50488H, disminuyen la entrada de  $\text{Ca}^{45}$  en sinaptosomas produciendo una disminución del AMPc intracelular. Cuando se administran previamente activadores de la adenilato ciclasa, se impide el efecto inhibitorio tanto de la clonidina como del U-50488H, lo que demuestra que la disminución de AMPc es parte del mecanismo de acoplamiento de los receptores con el sistema efector intracelular (XIANG y col., 1990).

#### Adaptación a la pérdida subcelular de calcio.

Los iones calcio, magnesio, sodio y litio, pero no el potasio, tienen un papel en la alteración de la unión específica de los opioides a sus receptores de membrana. Si la adaptación celular que ocurre en la membrana está relacionada con la tolerancia a la deplección de calcio, podría suceder que tras la administración continuada de opioides cambiara la concentración de algunos de esos iones. Transcurridas 24 horas de la administración de morfina, los niveles de calcio disminuyen por debajo del control, sin ocurrir cambios en el  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ni  $\text{Mg}^{++}$ . A las 72 horas, el calcio aumenta en más del 100% y el magnesio aumenta en un 13%, efectos que son revertidos por la naloxona.

Mediante estudios de la relación  $\text{Ca}^{40}/\text{Ca}^{45}$  tras diferentes tratamientos con opioides podemos concluir que la administración aguda de morfina produce una deplección de  $\text{Ca}^{40}$  que permite la unión de más  $\text{Ca}^{45}$  a la membrana, mientras que el tratamiento crónico causa una adaptación en la membrana, que da como resultado el aumento de sitios de unión para el calcio (ROSS y col., 1977).

#### Implicaciones funcionales de la alteración del metabolismo del $\text{Ca}^{++}$ .

El aumento del contenido de  $\text{Ca}^{++}$  y la disminución de la unión de  $\text{Ca}^{45}$  en la fracción sináptica durante el tratamiento crónico con morfina sugiere la expresión de repuestas adaptativas en la membrana. COLLIER (1966) presentó una teoría sobre la

génesis de la tolerancia y la dependencia física que postulaba un aumento del número de receptores opioides durante la tolerancia. Estudios posteriores no han encontrado tal aumento (KLEE y STREATY, 1974; HITZEMANN y col., 1974; PERT y SNYDER, 1973a; HÖLLT y col., 1975) y se ha propuesto una hipótesis alternativa que considera que aunque no haya alteración en el número de receptores, la unión de los opiáceos a sus receptores determinaría el inicio de una señal en la membrana que estaría acoplada con otros procesos intracelulares.

Desde un aspecto funcional, el aumento de calcio sinaptosomal se podría correlacionar con el aumento de la velocidad de recambio de neurotransmisores y con la inducción enzimática durante el desarrollo de la tolerancia. Este efecto se comprobó que era dosis dependiente y estereoespecífico (SMITH y col., 1972; GESSA y col., 1973).

REIS y col. (1970) describieron la inducción de la actividad de la tirosina hidroxilasa en estriado e hipotálamo de rata. Dado que esta enzima controla el paso limitante de la biosíntesis de dopamina y noradrenalina, sería interesante conocer la activación de la enzima por determinadas concentraciones de calcio.

MORGENROTH y col. (1975) demostraron que concentraciones fisiológicas de  $\text{Ca}^{++}$  en el rango de 50  $\mu\text{M}$  estimulaban a la enzima en neuronas centrales noradrenérgicas, mientras que el EGTA la activaba en neuronas dopaminérgicas (MORGENROTH y col., 1976). Esta aparente modulación de la actividad enzimática por la presencia o ausencia de calcio es de especial relevancia conociendo la capacidad de la noradrenalina, la dopamina y el calcio para activar la adenilato ciclasa. Es pues probable que la acción de los opiáceos pueda, indirectamente, por aumento del recambio de neurotransmisores, estimular la adenilato ciclasa.

Otros autores han encontrado que los nucleótidos cíclicos pueden desempeñar un papel en la acción de los opiáceos (COLLIER y ROY, 1974). Los opiáceos pueden actuar directamente sobre la actividad de la adenilato ciclasa como han sugerido KLEE

y col. (1975) y SHARMA y col. (1975b). La unión de los opioides a sus receptores, puede, por alteración del calcio de la membrana, activar sistemas de mensajeros que a su vez pueden activar mecanismos de transporte de cationes, neurotransmisores y actividades enzimáticas; o más importante, regular funciones celulares tan importantes como la fosforilación de proteínas nucleares y de la membrana sináptica.

La administración intratecal de agonistas de los receptores  $\mu$  y  $\delta$  junto con un inhibidor de la proteína quinasa C (PKC), han demostrado que disminuye el efecto antinociceptivo, junto con un aumento de AMPc, lo que sugiere la existencia de una interrelación entre el sistema de la PKC y los mecanismos de transducción subyacentes a la analgesia (ZHANG y col., 1990).

Los datos vistos anteriormente indican que existe una estrecha relación entre la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y la acción de los opioides, pero el mecanismo de esta interacción, ya sea en el axoplasma o en los canales iónicos de la membrana neuronal aún está por determinar.

## **2. OBJETIVOS**

El objetivo de este trabajo es estudiar el efecto de dos antagonista del calcio de familias químicas diferentes: el nimodipino, una dihidropiridina y el diltiazem, una benzotiazepina y compararlo con el de la clonidina sobre los signos de tolerancia y abstinencia a la morfina.

Utilizando para ello:

1. El bioensayo de fibra longitudinal-plexo mientérico de íleon de cobayo. Donde se estudiará el efecto de los fármacos, bien por tratamiento *in vivo* como administración en el baño de órganos, sobre la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico.
2. La rata como modelo de comportamiento para valorar los signos característicos del síndrome de abstinencia.
3. Las estructuras del SNC de rata para valorar la variación en los niveles de: 5-hidroxitriptamina, ácido 5-hidroxiindolacético y noradrenalina.



### **3. MATERIAL Y METODOS**

### 1.3.1. ESTUDIOS EN ILEON DE COBAYO.

#### 3.1.1. Aislamiento y montaje de la preparación fibra longitudinal-plexo mientérico de ileon de cobayo.

La preparación fibra longitudinal-plexo mientérico (FL-PM) se obtuvo a partir de cobayos tricolor (Alin S.A.) de ambos sexos según la técnica descrita inicialmente por AMBACHE (1954) para ileon de conejo. Los animales, de un peso comprendido entre 250-350 g, se mantuvieron en ayunas durante las 24 horas previas al sacrificio. Este se llevó a cabo mediante un golpe en la zona posterior de la cabeza y sección del paquete vasculo-nervioso del cuello y de la columna vertebral.

Mediante una incisión en la piel y seguidamente en la pared muscular de la zona abdominal se accedió al paquete intestinal, de donde se disecó un trozo del ileon distal de 30 cm de longitud aproximadamente, despreciándose los 10 cm más cercanos a la región ileo-cecal por tener una gran cantidad de receptores  $\alpha$ -adrenérgicos excitadores (MUNRO, 1953).

La porción del ileon así obtenida se mantuvo en un vaso de precipitado con solución de Krebs a temperatura ambiente.

La composición de la solución nutritiva de Krebs fue la siguiente:

	[mM]
- NaCl	118
- KCl	4.7
- CaCl <sub>2</sub>	2.5
- MgSO <sub>4</sub>	1.18
- NaHCO <sub>3</sub>	25
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.2
- glucosa	11

A continuación se tomaron segmentos de 5 cm de longitud aproximadamente

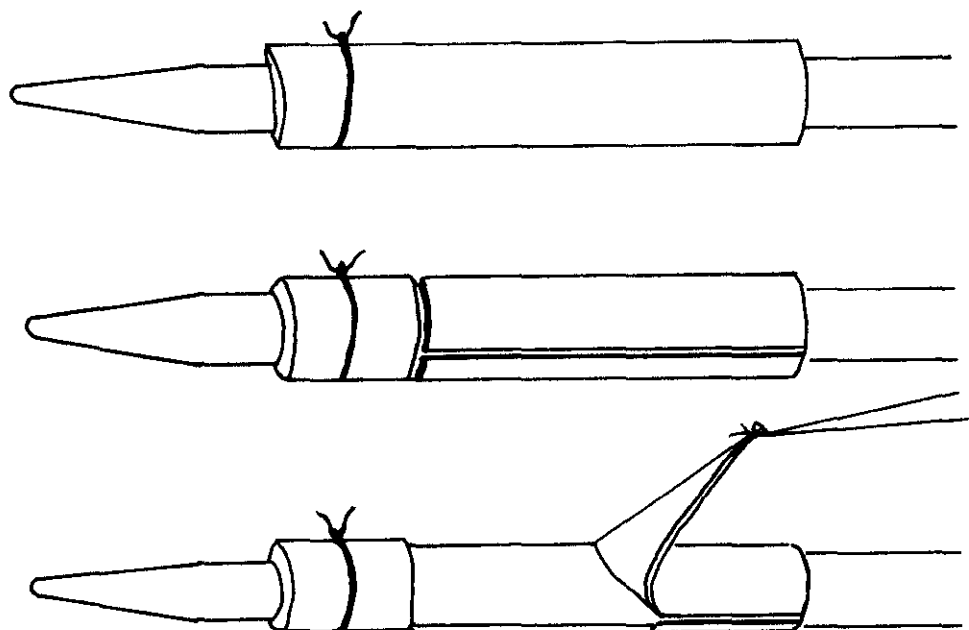
a los que se les separó el mesenterio usando pinzas y tijeras. Cada uno de dichos segmentos se intubó en una pipeta de un diámetro pequeño (4.5 mm) para no inutilizar la preparación por una distensión excesiva, y se sujetó a la misma mediante un hilo. Después se procedió a realizar dos cortes superficiales con un bisturí, sin seccionar completamente la pared intestinal, uno longitudinal y otro transversal, próximo al extremo atado. Los bordes de las incisiones se separaron con una torunda de algodón empapada en solución de Krebs. A continuación se ató un hilo en la zona de la fibra más cercana al hilo de sujeción y se tiró suavemente en dirección opuesta para separar la fibra longitudinal que lleva unido el plexo mientérico. La fibra se cortó aproximadamente a 2.5 cm del hilo de tracción y se ató con un segundo hilo en el otro extremo. Todas las operaciones descritas para obtener la preparación (Figura 7) se hicieron humedeciendo el segmento de íleon en solución de Krebs. En cada experiencia del mismo tipo no se emplearon más de tres preparaciones de un mismo cobayo.

La preparación FL-PM obtenida como se ha indicado, se montó en un baño de órganos (Figura 8) con copas de 40 ml llenas de solución de Krebs a una temperatura constante de 34°C y burbujeadas con gas carbógeno: 95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub> (Sociedad Española del Oxígeno).

La tensión basal con que se montaron las preparaciones fue de un gramo, dejándo que se relajaran durante 15 minutos antes de estimularlas eléctricamente.

Para la estimulación eléctrica, se utilizaron electrodos de platino en forma de anillo. La preparación se fijó al electrodo inferior con uno de los hilos y se pasó por el interior del otro, para conseguir una estimulación de campo. Empleamos un estimulador Grass SD9 que generaba ondas cuadradas de las siguientes características:

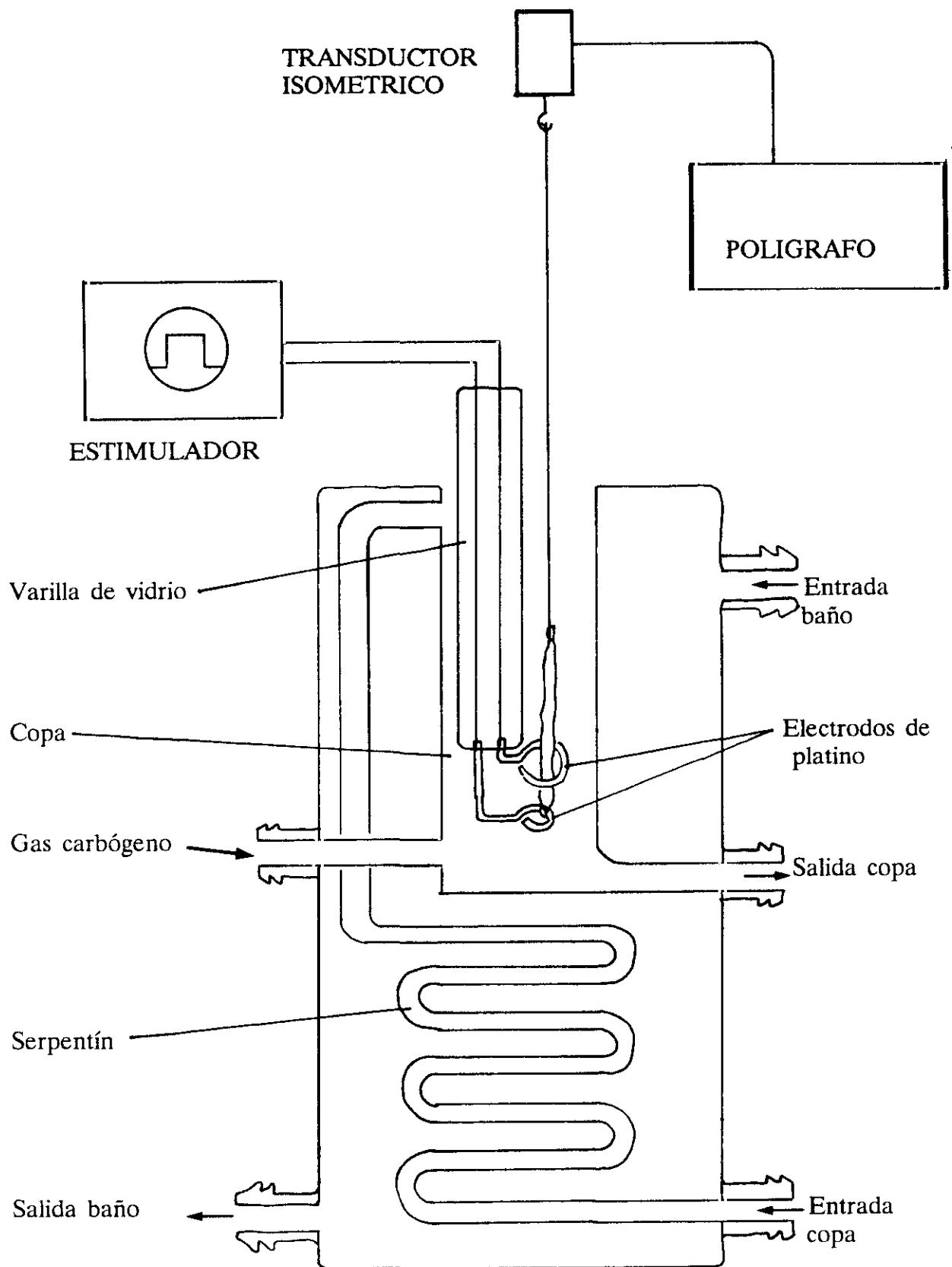
- frecuencia de 0,3 Hz.
- duración del pulso de 2 ms.
- voltaje supramaximal (100 V)



*Figura 7.* Fases del aislamiento de la preparación fibra longitudinal-plexo mientérico (FL-PM) de íleon de cobayo. (1) Intestino intubado. (2) Cortes superficiales, longitudinal y transversal. (3) Separación de las fibras por tracción.

Transcurridos quince minutos, si la fuerza de las contracciones inducidas por dicho estímulo se mantenía constante, se recogía mediante un transductor isométrico UF 1 (Panlab S.L.) registrándose en un polígrafo *OmniScribe* (*Bausch & Lomb*).

Aquellas preparaciones cuyas contracciones inducidas por estímulo eléctrico no superaron la tensión de 0.5 gramos, después del tiempo de estabilización, fueron desechadas.



*Figura 8.* Esquema del montaje de la preparación FL-PM en el baño de órganos y sistemas de estimulación y registro.

### 3.1.2. Inducción de tolerancia a la morfina en el cobayo.

El tratamiento crónico con morfina se realizó mediante una inyección subcutánea en el lomo de los animales de una suspensión oleosa de morfina base (COLLIER y col., 1972). La dosis de morfina empleada fue de 200 mg/kg.

Se prepararon 6 ml de suspensión con la siguiente composición:

- Morfina base	400 mg
- NaCl 0.9 % (p/v)	3 ml
- Parafina líquida	2.55 ml
- Arlacel A	0.45 ml

El Arlacel A procedía de Sigma Chem. Co. A-8009 y los otros componentes de Panreac.

Esta mezcla se agitó con una espátula hasta conseguir una suspensión homogénea. El volumen de inyección se calculó en función del peso de cada animal. Se empleó una jeringa de 10 cm<sup>3</sup> y una aguja Acofar de tamaño 35/12.

### 3.1.3. Valoración de la tolerancia.

La tolerancia se valoró estudiando el efecto de la morfina HCl en preparaciones FL-PM estimuladas eléctricamente procedentes de cobayos no tratados (control) y tratados con la suspensión oleosa de morfina base. Los animales tratados crónicamente con morfina se sacrificaron al cuarto día de la inyección de la suspensión oleosa de morfina. Con las preparaciones obtenidas se realizaron curvas dosis-respuesta añadiendo cuatro dosis de morfina de forma acumulativa, obteniéndose unas

concentraciones finales en baño, para cada dosis, de  $10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-7}$ ,  $4 \times 10^{-7}$  y  $8 \times 10^{-7}$  M. El intervalo entre dosis fue de 3 minutos; tiempo suficiente para que las dosis alcanzaran su efecto máximo. Los efectos producidos por la morfina sobre estas preparaciones fueron comparados con los obtenidos en preparaciones control por la prueba de la *t* de Student para valores no apareados.

#### 3.1.4. Efecto de la clonidina, el nimodipino y el diltiazem sobre la contracción de la preparación FL-PM.

Se ensayaron los efectos de los fármacos estudiados sobre la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico de la preparación FL-PM. Se midió la fuerza de la contracción transcurridos 15 minutos de la administración en el baño de órganos de:

- clonidina:  $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  M
- nimodipino:  $2.5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-7}$  M
- diltiazem:  $10^{-6}$ ,  $2 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-6}$ ,  $8 \times 10^{-6}$  M

Los fármacos se añadieron de forma acumulativa cada 15 minutos. Los valores indican las concentraciones finales alcanzadas en el baño después de cada administración.

#### 3.1.5. Modificación de la tolerancia en la preparación FL-PM por los distintos tratamientos.

La tolerancia se valoró como ya se ha indicado en el apartado 2.1.3.

Se estudió el efecto del tratamiento con clonidina, nimodipino y diltiazem en preparaciones FL-PM estimuladas eléctricamente procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina.

Los tratamientos *in vivo* se realizaron administrando intraperitonealmente (i.p.) una hora antes del sacrificio los siguientes fármacos:

- clonidina (75, 150, 300  $\mu$ g/kg).
- nimodipino (5, 10, 20 mg/kg).
- diltiazem (10, 20, 40 mg/kg).

Las distintas dosis de cada fármaco se administraron en grupos de animales diferentes.

En las preparaciones obtenidas de los cobayos así tratados se realizaron curvas dosis-respuesta para estudiar como modificaban los distintos fármacos la sensibilidad al efecto inhibidor de la morfina.

### 3.1.6. Valoración de la dependencia a la morfina.

#### 3.1.6.1. Por administración de naloxona *in vitro*.

Es un hecho clásicamente conocido que la administración de naloxona al baño de órganos desencadena en la preparación FL-PM procedente de cobayos tratados crónicamente con morfina y no estimulada eléctricamente una contractura muscular sostenida que se utiliza como una medida de la abstinencia en dicha preparación (EHRENPREIS y col., 1972; SCHULZ y HERZ, 1976; HAMMOND y col., 1976) (Figura 9). La naloxona se administró después de registrar la contracción inducida por estímulo eléctrico, suspender dicho estímulo y esperar cinco minutos para estabilizar la motilidad



espontánea de la preparación. La concentración de naloxona en el baño fue de  $10^{-6}$  M. Después de registrar la contracción inducida por naloxona se volvió a estimular eléctricamente la preparación para ver si se modificaba la contracción y se registró la fuerza de dicha contracción.

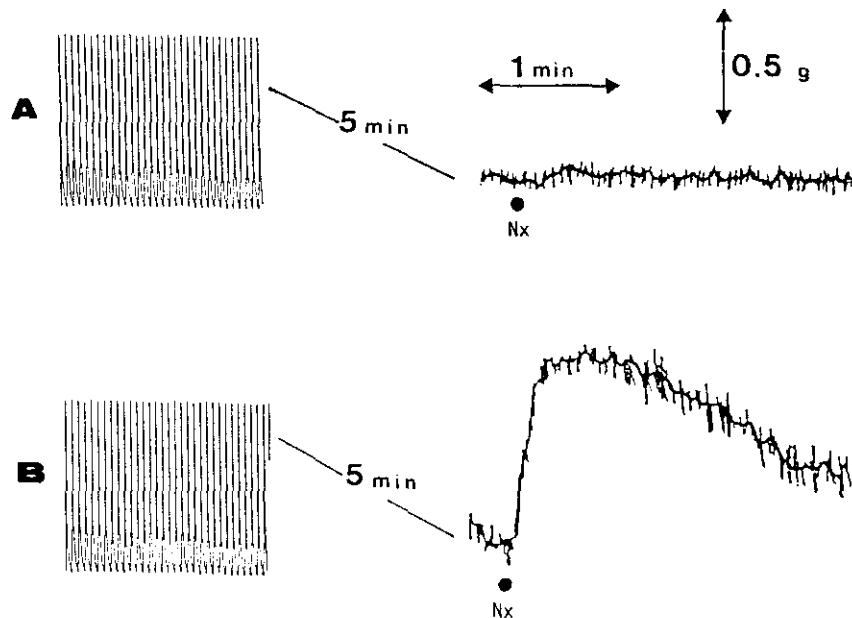


Figura 9. Efecto de la administración de naloxona (Nx) ( $10^{-6}$  M) en la preparación FL-PM procedente del íleon de cobayos control (A) y tratados crónicamente con morfina (B).

### 3.1.6.2. Por retirada del depósito de morfina *in vivo*.

Al tercer día de la inyección subcutánea se eliminó el depósito de morfina de la inyección subcutánea, bajo anestesia ligera con éter y un lavado con una torunda de algodón y suero a presión. Se aplicó un punto de sutura para facilitar la cicatrización de la incisión realizada.

Después de la eliminación del depósito de morfina, los cobayos fueron sacrificados a las 12, 24, 48 y 72 horas para estudiar la fuerza de la contracción de la preparación FL-PM inducida por estímulo eléctrico y su sensibilidad a la acción de la morfina.

### 3.1.7. Efecto de la clonidina, el nimodipino y el diltiazem sobre la abstinencia a la morfina.

#### 3.1.7.1. Administración *in vitro*.

Los distintos fármacos se administraron en el baño de órganos sobre preparaciones procedentes de animales tratados crónicamente con morfina y montadas en solución Krebs con morfina  $10^{-7}$  M. Cada dosis se dejó actuar durante 15 minutos antes de añadir la naloxona.

A continuación se indican los fármacos empleados y sus concentraciones en el baño:

- clonidina:  $10^{-8}$ ,  $7.5 \times 10^{-7}$ ,  $5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M
- nimodipino:  $7.5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $2.5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$ ,  $10^{-6}$  M
- diltiazem:  $5 \times 10^{-7}$ ,  $2.5 \times 10^{-7}$ ,  $10^{-6}$ ,  $10^{-5}$  M

Se valoró la fuerza de la contracción muscular inducida por naloxona (Apartado 3.1.6.1) en las preparaciones procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina, y en ausencia o presencia de los distintos fármacos.

#### 3.1.7.2. Tratamientos *in vivo*.

Los cobayos tratados crónicamente con morfina fueron inyectados por vía intraperitoneal haciéndose varios grupos con los diferentes fármacos y dosis:

- clonidina: 7.5, 75, 150 y 300  $\mu\text{g/kg}$
- nimodipino: 0.5, 5, 10 y 20  $\text{mg/kg}$
- diltiazem: 1, 10, 20 y 40  $\text{mg/kg}$

Los animales fueron sacrificados al cabo de una hora y las preparaciones FL-PM se montaron en el baño de órganos con solución Krebs. Se comparó la presentación de contracción muscular inducida por naloxona (Apartado 3.1.7.1) en las preparaciones procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina en ausencia y presencia de las distintas dosis de los fármacos.

### 3.2. VALORACION DE LOS SIGNOS DE ABSTINENCIA A LA MORFINA EN RATA.

Se emplearon ratas macho de la cepa Sprague-Dawley (Panlab S.A.), de un peso comprendido entre 200 y 250 g, mantenidas bajo un ciclo de luz/oscuridad de 12 h (luz de 8 h a 20 h), a temperatura constante (23 °C) y con libre acceso a comida y bebida. Las ratas se hicieron tolerantes a la morfina por el método descrito anteriormente para el cobayo (Apartado 3.1.2, inyección subcutánea de una emulsión de morfina de 200 mg/kg) y se les desencadenó el síndrome de abstinencia al tercer día mediante una inyección intraperitoneal de naloxona (Nx) (1 mg/kg) 30 minutos antes del sacrificio.

Se estudiaron signos de comportamiento típicos del síndrome de abstinencia en los siguientes grupos de animales:

- control.
- control + naloxona.
- control + clonidina.
- control + nimodipino.
- control + diltiazem.
- tratados crónicamente con morfina.

- tratados crónicamente con morfina + naloxona.
- tratados crónicamente con morfina + clonidina + naloxona.
- tratados crónicamente con morfina + nimodipino + naloxona.
- tratados crónicamente con morfina + diltiazem + naloxona.

Cada grupo constaba de ocho animales.

Los tratamientos con la clonidina, el nimodipino y el diltiazem se hicieron una hora antes del sacrificio. Las dosis empleadas fueron 300 µg/kg de clonidina, 10 mg/kg de nimodipino y 20 mg/kg de diltiazem.

La observación de los animales se realizó durante 30 minutos colocándolos en una caja de madera con las siguientes medidas: 79 x 41 x 35 cm (largo x ancho x alto). Los resultados se recogieron sin tener el observador conocimiento del tratamiento de cada lote de ratas.

Los signos de comportamiento valorados que se presentaron frecuentemente fueron:

1. aseo (*grooming*)
2. castañeteo de dientes
3. pérdida de peso
4. sacudidas (*wet dog shakes*)
5. saltos

En ellos se consideró el número de presentaciones calculándose la media y el error estándar de la misma.

Otro grupo de signos fue de difícil cuantificación y se consideró la presencia o ausencia de los mismos:

6. cromodacriorrea
7. diarrea
8. extensión abdominal (*writhing*)
9. ptosis palpebral
10. vocalización

Estos se consideraron variables cualitativas, verificándose la significación estadística mediante la prueba de independencia de la ji al cuadrado ( $\chi^2$ ).

### 3.3. NIVELES DE MONOAMINAS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.

Se utilizaron ratas de la cepa Sprague-Dawley en las mismas condiciones ya expuestas en el apartado anterior y se hicieron los mismos grupos. Se determinaron los niveles de 5-hidroxitriptamina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y noradrenalina en distintas estructuras del sistema nervioso central.

Los distintos fármacos se administraron intraperitonealmente una hora antes del sacrificio. Se emplearon las siguientes dosis: clonidina 300  $\mu$ g/kg, nimodipino 10 mg/kg y diltiazem 20 mg/kg.

#### 3.3.1. Aislamiento de las estructuras del SNC.

Al cabo de una hora de la inyección de los distintos fármacos, administrados siempre por vía i.p., los animales fueron sacrificados con guillotina y disecadas distintas estructuras del sistema nervioso central:

- Estructuras intracraneales. Después de practicar la craneotomía y extraer la

masa encefálica, se disecaron en frío, con pinza curva y bisturí, las siguientes estructuras:

- BULBO
- CORTEZA
- HIPOCAMPO
- MESENCEFALO

- Estructura extracraneal:

- MEDULA ESPINAL

Se aisló cortando la columna vertebral a nivel sacro-lumbar e inyectando por el canal medular suero fisiológico con un aguja roma en sentido caudo-craneal hasta conseguir su salida.

Las meninges de las diferentes estructuras fueron eliminadas con pinzas.

El sacrificio de los animales se llevó a cabo por la mañana entre las 11 y las 13 horas.

Las distintas estructuras aisladas se congelaron sobre anhídrido carbónico sólido granulado procedente de Carbueros Metálicos S.A. y se guardaron en congelador a -80° C hasta su posterior procesamiento.

### 3.3.2. Extracción y análisis de las monoaminas en distintas estructuras del sistema nervioso central de rata.

Las diferentes estructuras del SNC se pesaron en una balanza de precisión (*Mettler H64*) y se homogeneizaron en tubos de polietileno mediante un

homogeneizador de émbolo (*Heidolph*) en diferentes volúmenes de una solución de ácido perclórico 0.4 M y disulfito sódico al 0.1 %. Se homogeneizaron en cuatro volúmenes el bulbo, el hipocampo, el mesencéfalo y la médula espinal, y en tres volúmenes la corteza. Después, se centrifugaron a 19000 r.p.m. (25000 g) durante 20 minutos y a una temperatura de 4° C en una centrífuga *Centrikon T-2080* (*Kontron Instruments*) con un rotor TFT 7513 de ángulo fijo. Los tubos se decantaron y los sobrenadantes se guardaron en un congelador (*Revco*) a -80° C hasta el momento de su posterior análisis por cromatografía líquida de alta presión (HPLC).

Para la separación y cuantificación de las monoaminas utilizamos un sistema de cromatografía líquida de alta presión (HPLC) de fase reversa con detección electroquímica.

- Preparación de la fase móvil.

La fase móvil empleada fue diferente para la separación de catecolaminas (noradrenalina) y para la separación de indolalquilaminas (5-hidroxitriptamina, ácido 5-hidroxiindolacético).

A) Composición de la fase móvil para catecolaminas:

- ácido cítrico 0.1 M (Probus N° 11510)
- hidrogenofosfato de sodio dihidratado 0.1 M (Merck N° 6580)
- ácido 1-octanosulfónico (PIC) (Sigma Chem. Co. O-7877)
- metanol para HPLC 10 v/v (Scharlau N° 301)
- pH = 3.45

La adición de PIC como formador de par iónico es imprescindible para la detección de catecolaminas, ya que aumenta su tiempo de retención impidiendo que eluyan en el frente de inyección.

B) Composición de la fase móvil para indolalquilaminas:

- ácido cítrico 0.1 M (Probus N° 11510).
- hidrogenofosfato de disodio dihidratado 0.1 M (Merck N° 6580).
- metanol para HPLC 10 v/v (Scharlau N° 301).
- pH = 3.45

El agua desionizada empleada para la preparación de la fase móvil estaba procesada mediante un sistema Milli-Q (*Waters*), adosado a un sistema de purificación Milli-RO (*Waters*).

Una vez disueltos los componentes, la fase móvil se filtró mediante vacío a través de filtros (*Millipore* HATF04700) de un tamaño de poro de 0.45  $\mu\text{m}$ . El filtrado se desgasificó a vacío durante 20 minutos antes de pasarse por el cromatógrafo.

● Preparación de los estándares.

La calibración del sistema se efectuó por inyección del estándar externo correspondiente y la realización de una curva de calibrado. Para la evaluación de indolalquilaminas se prepararon soluciones de 8 ng de 5-hidroxitriptamina (Sigma H-7752) y 4 ng de ácido 5-hidroxiindol-3-acético (Sigma H-8876) en una solución de ácido perclórico 0.4 M y disulfito sódico al 0.1 %. Estas se mezclaron y, diluidas tres veces a la mitad, dieron lugar a cuatro soluciones que conformaban la curva de calibrado. Para la evaluación de noradrenalina se preparó un estándar de 4 ng de noradrenalina (Sigma A-9512) a partir del cual se prepararon cuatro diluciones sucesivas.



- Sistema cromatográfico.

La bomba (*Waters 510*) se programó a un flujo de 1 ml/min, alcanzándose una presión de 2000 psi. El volumen de inyección fue de 20  $\mu$ l (Inyector *Reodyne*). Las muestras pasaron por una precolumna (*Guard-Pak C18 Resolve, Waters*) antes de pasar por la columna *Resolve C18 (Waters)*. Esta tenía 15 cm de longitud x 3.4 mm de diámetro interno y un relleno de 5  $\mu$ m. Usamos un detector electroquímico (*Waters 460*) de tipo amperométrico fijando una diferencia de potencial de 0.7 V entre el electrodo de trabajo (pasta vítrea de carbono) y el de referencia (Ag/AgCl). Los resultados fueron recogidos por un integrador-registrador *Waters Data Module-745*.

### 3.4. FARMACOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.

Los fármacos utilizados en la presente Tesis Doctoral han sido los siguientes:

- Morfina HCl (Alcaliber S.A.).
- Morfina base. (Alcaliber S.A.).
- Naloxona HCl (Sigma Chem. Co. N-7758).
- Clonidina (Laboratorios Boehringer Ingelheim, S.A.).
- Nimodipino (Química Farmacéutica Bayer, S.A.).
- Diltiazem (Laboratorios Dr. Esteve, S.A.).

La morfina HCl, la naloxona, la clonidina y el diltiazem se disolvieron en agua desionizada.

Las soluciones empleadas para administrar los fármacos *in vivo* se prepararon como a continuación se detalla. Para el caso de el nimodipino, debido a su liposolubilidad, se disolvió en un vehículo recomendado por los Laboratorios Bayer S.A.,

que contenía:

- polietilenglicol 400	85 %
- glicerina	5%
- agua desionizada	10%

El resto de los fármacos se disolvieron en agua desionizada.

En lo que respecta a la preparación de las soluciones para los tratamientos *in vitro*. En el caso del nimodipino, se preparó una solución madre de concentración  $2 \times 10^{-3}$  M en etanol y a partir de ella se preparó otra de concentración  $2 \times 10^{-5}$  M en agua desionizada. Debido a que el nimodipino se descompone por radiación luminosa inferior a 450 nm, empleamos durante su manipulación luz amarilla. Para el caso del diltiazem, se preparó una solución madre de concentración  $4 \times 10^{-3}$  M y a partir de ella se preparó otra  $8 \times 10^{-4}$  M, ambas disueltas en agua desionizada. El resto de los fármacos se disolvieron en agua desionizada. Las soluciones se conservaron en nevera, preparándose nuevas cada semana.

### 3.5. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LOS RESULTADOS.

Los resultados obtenidos fueron valorados estadísticamente de la siguiente forma:

- Se calculó la media  $\pm$  el error estándar de la media (E.S.M.) para los datos de tipo cuantitativo y se aplicaron las pruebas de la *t* de Student y el análisis de la varianza. El número de experiencias realizadas no fue en ningún caso inferior a seis.
- Para los datos de tipo cualitativo se elaboraron tablas de contingencia de 2 x 2 y se hizo un contraste de hipótesis mediante la prueba de ji al cuadrado ( $\chi^2$ ).

Consideramos las diferencias como significativas ( $* = p < 0.05$ ), muy significativas ( $** = p < 0.01$ ) y altamente significativas ( $*** = p < 0.001$ ).

Los cálculos se hicieron empleando un ordenador personal y los programas estadísticos: *Pharmacologic Calculations*, *Sigma* y *Microstat*.

## **4. RESULTADOS**

#### 4.1. ESTUDIOS EN ILEON DE COBAYO.

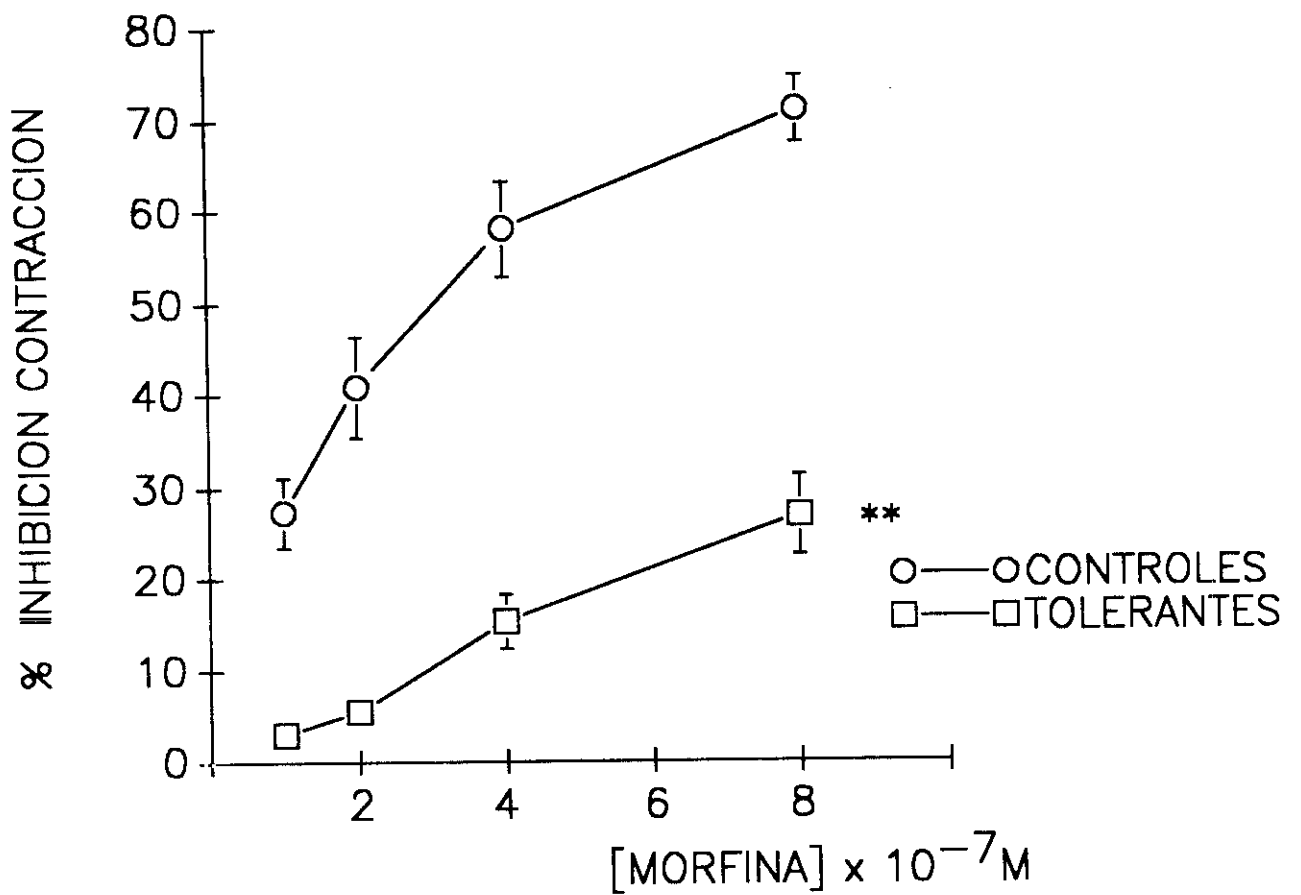
##### 4.1.1. Desarrollo de tolerancia en la preparación FL-PM.

La administración acumulativa de morfina a las concentraciones de  $10^{-7}$ ,  $2 \times 10^{-7}$ ,  $4 \times 10^{-7}$  y  $8 \times 10^{-7}$  M en el baño de órganos, causó una inhibición dosis-dependiente de la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico en la preparación fibra longitudinal-plexo mientérico (FL-PM) de íleon de cobayo. La inhibición fue significativamente menor en preparaciones FL-PM procedentes de animales tratados crónicamente con morfina (Tabla 3, Figura 10).

TABLA 3. Efecto inhibitor de la morfina sobre la contracción de la preparación fibra longitudinal-plexo mientérico (FL-PM) de íleon de cobayo procedente de animales controles y tolerantes a la morfina.

[MORFINA] (M)	% INHIBICION CONTRACCION	
	CONTROL	TOLERANTES **
$10^{-7}$	$27.3 \pm 3.9$	$3.0 \pm 0.8$
$2 \times 10^{-7}$	$40.9 \pm 5.5$	$5.5 \pm 1.4$
$4 \times 10^{-7}$	$58.1 \pm 5.2$	$15.3 \pm 3.0$
$8 \times 10^{-7}$	$71.1 \pm 3.6$	$26.9 \pm 4.4$

Los datos representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil  $\pm$  E.S.M.,  $n \geq 9$ , \*\* =  $p < 0.01$ .



*Figura 10.* Efecto de la administración de morfina en la preparación FL-PM procedente de animales control y tratados crónicamente con morfina. Cada punto representa el porcentaje de inhibición medio de la contracción y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 9$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

#### 4.1.2. Efecto de la clonidina, el nimodipino y el diltiazem sobre la preparación FL-PM estimulada eléctricamente.

##### Efecto de la clonidina en FL-PM.

La clonidina administrada en el baño de órganos a distintas concentraciones ( $10^{-9}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $10^{-6}$  M) produjo una inhibición dosis-dependiente de la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico en la preparación FL-PM de íleon de cobayo. Esta inhibición fue significativamente menor en preparaciones procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina (Tabla 4, Figura 11).

El tratamiento de los cobayos con 300  $\mu$ g/kg de clonidina por vía i.p. una hora antes del sacrificio, no alteró significativamente la capacidad de la clonidina para inhibir las contracciones de la preparación FL-PM de íleon de cobayo.

TABLA 4. Efecto de la clonidina sobre la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico en preparaciones FL-PM de íleon de cobayo procedentes de animales control y tolerantes a morfina.

[CLONIDINA] (M)	% INHIBICION	
	CONTROL	TOLERANTES **
$10^{-9}$	$8.1 \pm 2.1$	$0.25 \pm 0.25$
$10^{-8}$	$42.9 \pm 5.6$	$4.0 \pm 1.8$
$10^{-7}$	$58.0 \pm 5.0$	$14.4 \pm 5.0$
$10^{-6}$	$63.1 \pm 6.6$	$15.5 \pm 5.6$

Los valores representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil  $\pm$  E.S.M.,  $n \geq 8$ , \*\*=  $p < 0.01$ .

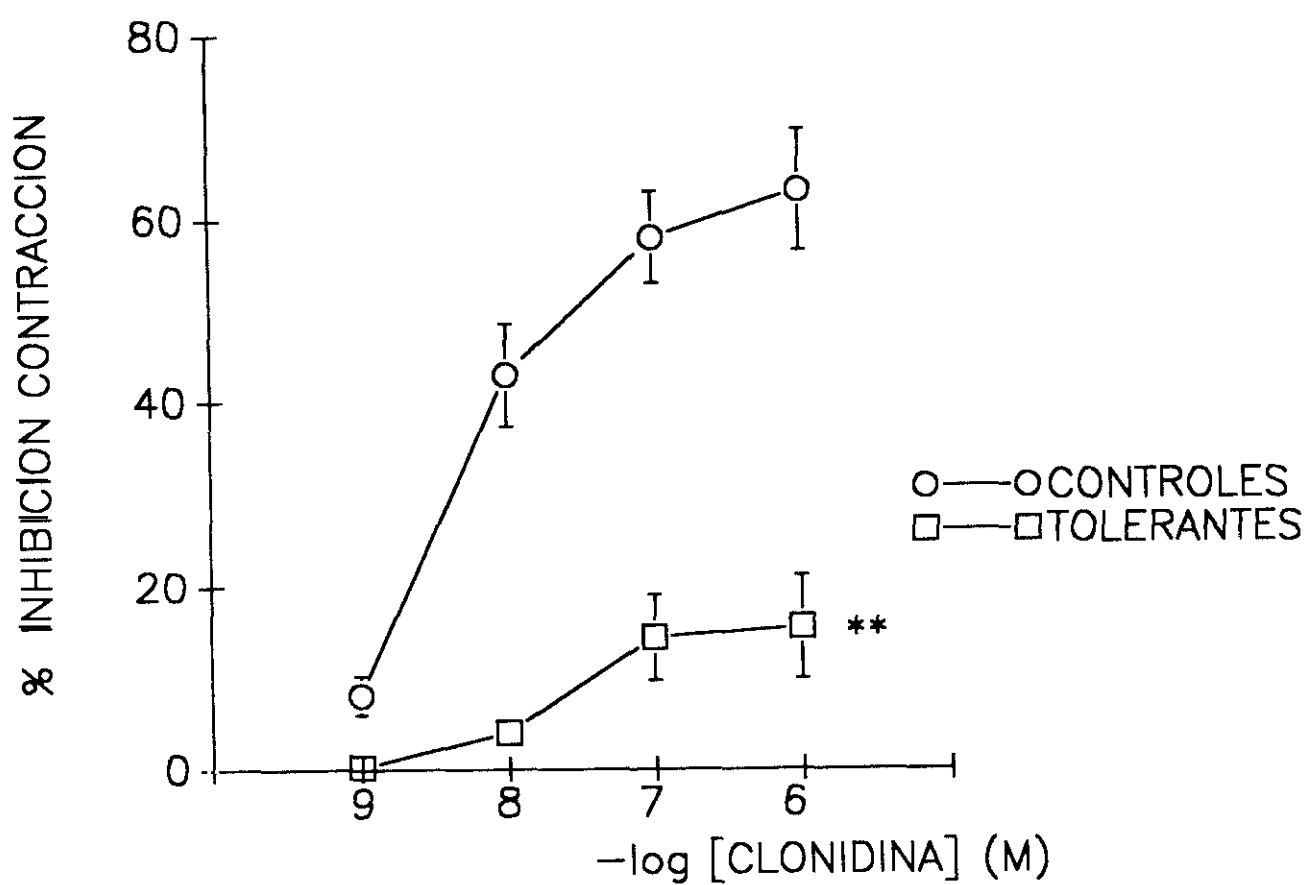


Figura 11. Efecto de la administración de clonidina en la preparación FL-PM procedente de animales control y tratados crónicamente con morfina. Cada punto representa el porcentaje de inhibición medio de la contracción y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 8$ , \*\* =  $p < 0.01$ .



Efecto del nimodipino en FL-PM.

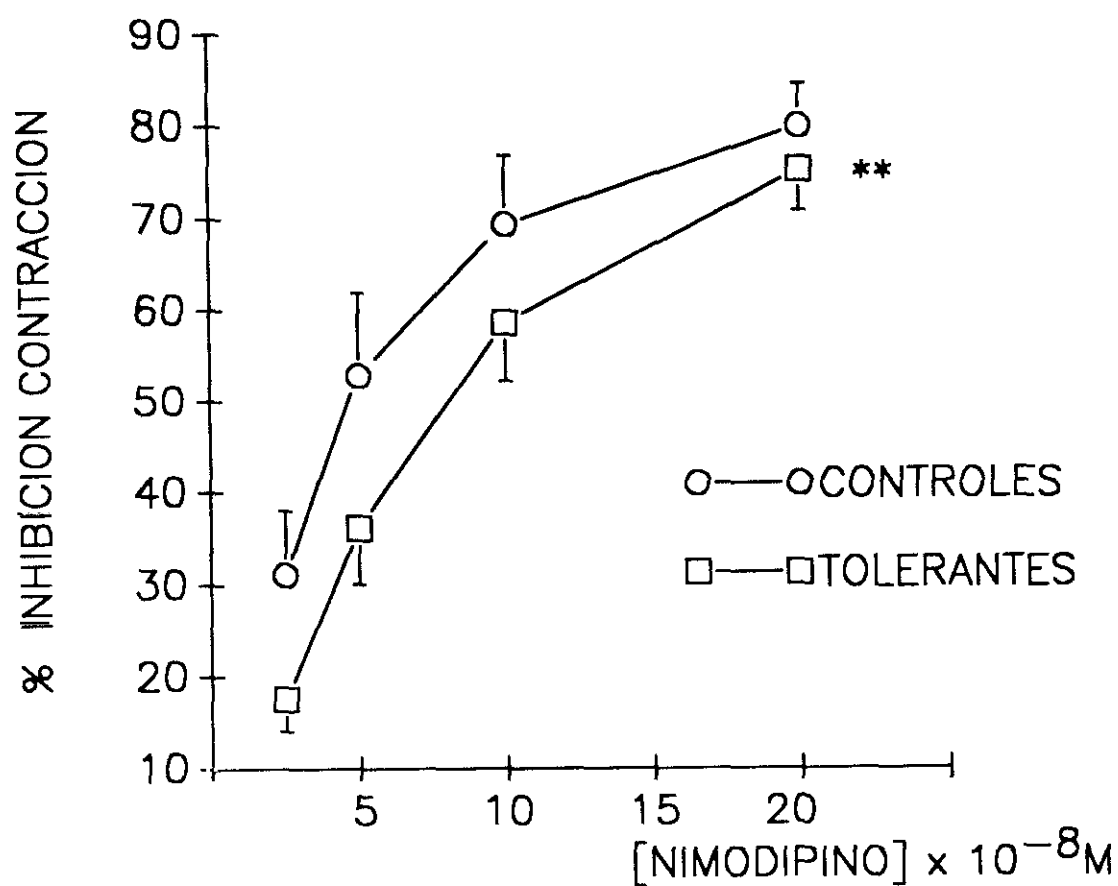
El nimodipino administrado de forma acumulativa ( $2.5 \times 10^{-8}$ ,  $5 \times 10^{-8}$ ,  $10^{-7}$  y  $2 \times 10^{-7}$  M) al baño de órganos produjo una inhibición dosis-dependiente de la respuesta contráctil inducida por estimulación eléctrica. Esta inhibición mostró diferencias significativas en las preparaciones procedentes de animales tratados crónicamente con morfina frente a la que presentaban las preparaciones procedentes de animales control (Tabla 5, Figura 12).

El tratamiento con nimodipino a la dosis de 5 mg/kg una hora antes de sacrificar a los animales no alteró significativamente la capacidad del nimodipino para inhibir las contracciones inducidas por estímulo eléctrico.

TABLA 5. Efecto del nimodipino sobre la contracción inducida por estímulo eléctrico en la preparación FL-PM de íleon de cobayo procedente de animales controles y tratados crónicamente con morfina.

[NIMODIPINO] (M)	% INHIBICION	
	CONTROL	TOLERANTES **
$2.5 \times 10^{-8}$	$31.1 \pm 6.9$	$17.6 \pm 3.5$
$5 \times 10^{-8}$	$52.8 \pm 9.0$	$36.1 \pm 6.0$
$10^{-7}$	$69.3 \pm 7.4$	$58.6 \pm 6.4$
$2 \times 10^{-7}$	$79.8 \pm 4.5$	$75.1 \pm 4.4$

Los valores representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil  $\pm$  E.S.M.,  $n \geq 8$ , \*\* =  $p < 0.01$ .



*Figura 12.* Efecto de la administración de nimodipino en la preparación FL-PM procedente de animales control y tratados crónicamente con morfina. Cada punto representa el porcentaje de inhibición medio de la contracción y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 8$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

Efecto del diltiazem en FL-PM.

El diltiazem administrado en el baño de órganos en concentraciones acumulativas ( $10^{-6}$ ,  $2 \times 10^{-6}$ ,  $4 \times 10^{-6}$  y  $8 \times 10^{-6}$  M) produjo una inhibición de la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico que fue dependiente de la dosis. La inhibición fue mayor en las preparaciones procedentes de animales tolerantes siendo esta diferencia estadísticamente significativa con respecto a las preparaciones controles (Tabla 6, Figura 13).

El tratamiento con una inyección de 10 mg/kg por vía i.p. de diltiazem una hora antes de sacrificar los animales no alteró significativamente la inhibición de la respuesta contráctil producida por el diltiazem.

TABLA 6. Efecto del diltiazem i.p. en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo procedentes de animales control y tolerantes a la morfina.

[DILTIAZEM] (M)	% INHIBICION	
	CONTROL	TOLERANTES **
$10^{-6}$	$21.9 \pm 5.6$	$48.0 \pm 8.2$
$2 \times 10^{-6}$	$40.1 \pm 7.5$	$67.4 \pm 6.9$
$4 \times 10^{-6}$	$53.4 \pm 7.6$	$81.2 \pm 4.8$
$8 \times 10^{-6}$	$63.9 \pm 6.7$	$87.1 \pm 3.3$

Los valores representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil  $\pm$  E.S.M., n= 9, \*\*=  $p < 0.01$ .

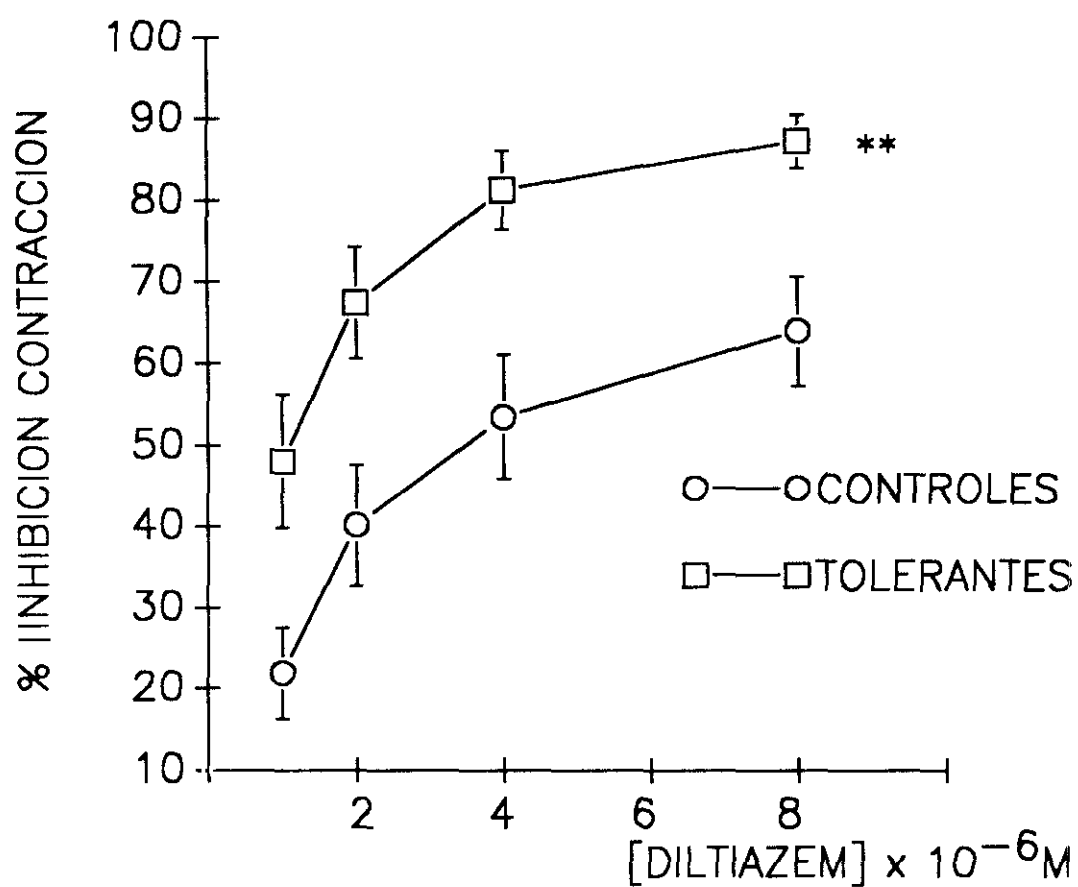


Figura 13. Efecto de la administración de diltiazem en la preparación FL-PM procedente de animales control y tratados crónicamente con morfina. Cada punto representa el porcentaje de inhibición medio de la contracción y las barras verticales el E.S.M.,  $n = 9$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

#### 4.1.3. Modificación de la tolerancia por los distintos tratamientos.

##### 4.1.3.1. Modificación de la tolerancia a la morfina por la **clonidina**.

En los animales control tratados i.p. con clonidina (75, 150 y 300  $\mu\text{g/kg}$ ), una hora antes del sacrificio, sólo la dosis más alta disminuyó significativamente la inhibición producida por la morfina en la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico (Tabla 7, Figura 14).

En el caso de los animales tolerantes a la morfina, la clonidina disminuyó significativamente la sensibilidad de las preparaciones procedentes de estos animales al efecto inhibitor de la morfina para todas las dosis empleadas (Tabla 8, Figura 14).

TABLA 7. Efecto de la morfina sobre la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo procedentes de animales control (C) y tratados con clonidina i.p. una hora antes del sacrificio.

[MORFINA] (M)	C	CLONIDINA ( $\mu\text{g/kg}$ )		
		75	150	300 **
$10^{-7}$	$27.3 \pm 3.9$	$31.1 \pm 5.7$	$25.7 \pm 4.3$	$19.5 \pm 3.3$
$2 \times 10^{-7}$	$40.9 \pm 5.5$	$46.6 \pm 7.5$	$43.8 \pm 5.2$	$31.0 \pm 5.0$
$4 \times 10^{-7}$	$58.1 \pm 5.2$	$59.2 \pm 7.7$	$58.2 \pm 5.2$	$45.1 \pm 5.4$
$8 \times 10^{-7}$	$71.1 \pm 3.6$	$64.2 \pm 8.1$	$65.6 \pm 5.2$	$54.5 \pm 5.1$

Los valores representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil  $\pm$  E.S.M.,  $n \geq 9$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

TABLA 8. Efecto de la morfina sobre la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo procedentes de animales tolerantes a morfina (T) y tolerantes tratados con clonidina i.p. una hora antes del sacrificio.

[MORFINA] (M)	T	CLONIDINA ( $\mu\text{g/kg}$ )			
		7.5**	75**	150**	300**
$10^{-7}$	$3.0 \pm 0.9$	$4.2 \pm 0.4$	$2.1 \pm 0.8$	$2.1 \pm 0.7$	$2.7 \pm 1.1$
$2 \times 10^{-7}$	$5.5 \pm 1.6$	$7.8 \pm 1.6$	$4.1 \pm 1.3$	$3.1 \pm 1.0$	$7.7 \pm 3.2$
$4 \times 10^{-7}$	$16.1 \pm 3.7$	$12.0 \pm 3.4$	$7.1 \pm 2.0$	$6.2 \pm 5.5$	$20.5 \pm 5.5$
$8 \times 10^{-7}$	$30.1 \pm 5.3$	$19.6 \pm 6.0$	$10.8 \pm 2.9$	$10.4 \pm 3.3$	$33.2 \pm 6.7$

Los valores representan el porcentaje de inhibición medio  $\pm$  E.S.M. de la respuesta contráctil,  $n \geq 6$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

#### 4.1.3.2. Modificación de la tolerancia a la morfina por el nimodipino.

En los animales control tratados con nimodipino (5, 10 y 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio, sólo la dosis de 10 mg/kg disminuyó significativamente la sensibilidad de las preparaciones al efecto inhibitor de la morfina sobre la contracción muscular inducida por estímulo eléctrico (Tabla 9, Figura 15).

En los animales tratados crónicamente con morfina y con nimodipino (0.5, 5, 10 y 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio, las dosis de 5, 10 y 20 mg/kg disminuyeron la sensibilidad de las preparaciones FL-PM al efecto inhibitor de la morfina (Tabla 10, Figura 15).

TABLA 9. Efecto de la morfina sobre la contracción inducida por estímulo eléctrico en preparaciones FL-PM de íleon de cobayo procedentes de animales control (C) y tratados con nimodipino i.p. una hora antes del sacrificio.

[MORFINA] (M)	C	NIMODIPINO (mg/kg)		
		5	10 <sup>**</sup>	20
10 <sup>-7</sup>	27.3±3.9	26.8±4.8	20.0±5.2	26.8±5.9
2x10 <sup>-7</sup>	40.9±5.5	43.3±5.8	34.8±8.0	41.6±5.9
4x10 <sup>-7</sup>	58.1±5.2	58.6±4.6	45.6±9.5	58.1±5.6
8x10 <sup>-7</sup>	71.1±3.6	71.9±3.5	55.2±9.8	68.6±5.1

Los valores representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil ± E.S.M., n≥9, \*\*= p<0.01

TABLA 10. Efecto de la morfina sobre la contracción inducida por estímulo eléctrico en preparaciones FL-PM de íleon de cobayo procedentes de animales tolerantes (T) y tolerantes tratados con nimodipino i.p. una hora antes del sacrificio.

[MORFINA] (M)	T	NIMODIPINO (mg/kg)			
		0.5	5 <sup>**</sup>	10 <sup>**</sup>	20 <sup>**</sup>
10 <sup>-7</sup>	3.0±0.8	3.6±1.7	0.7±0.7	2.8±0.9	1.9±0.9
2 x10 <sup>-7</sup>	5.5±1.4	7.6±2.3	3.6±1.0	6.4±1.7	3.2±1.1
4 x10 <sup>-7</sup>	15.3±3.0	12.4±3.4	4.9±1.5	10.4±2.8	5.3±1.8
8 x10 <sup>-7</sup>	26.9±4.4	22.0±5.1	11.1±2.6	18.1±4.8	13.4±4.5

Los valores representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil ± E.S.M., n≥6, \*\*= p<0.01.

#### 4.1.3.3. Modificación de la tolerancia a la morfina por el diltiazem.

En los animales control tratados i.p. con diltiazem (10, 20, 40 mg/kg) una hora antes del sacrificio, las dosis de 10 y 20 mg/kg disminuyeron significativamente la sensibilidad de las preparaciones al efecto inhibitor de la morfina (Tabla 11, Figura 16).

En las preparaciones procedentes de animales tolerantes, dicha sensibilidad resultó también estar significativamente disminuida para las mismas dosis de diltiazem (10 y 20 mg/kg) (Tabla 12, Figura 16).

TABLA 11. Efecto de la morfina en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo procedentes de animales control (C) y tratados con diltiazem i.p. una hora antes del sacrificio.

[MORFINA] (M)	C	DILTIAZEM (mg/kg)		
		10**	20**	40
10 <sup>-7</sup>	27.3±3.9	22.0±4.7	15.8±3.4	25.9±3.8
2 x10 <sup>-7</sup>	40.9±5.5	35.6±7.7	30.9±5.2	42.3±4.9
4 x10 <sup>-7</sup>	58.1±5.2	49.2±8.3	43.6±6.0	58.8±4.9
8 x10 <sup>-7</sup>	71.1±3.6	60.5±7.9	55.1±6.2	71.6±4.6

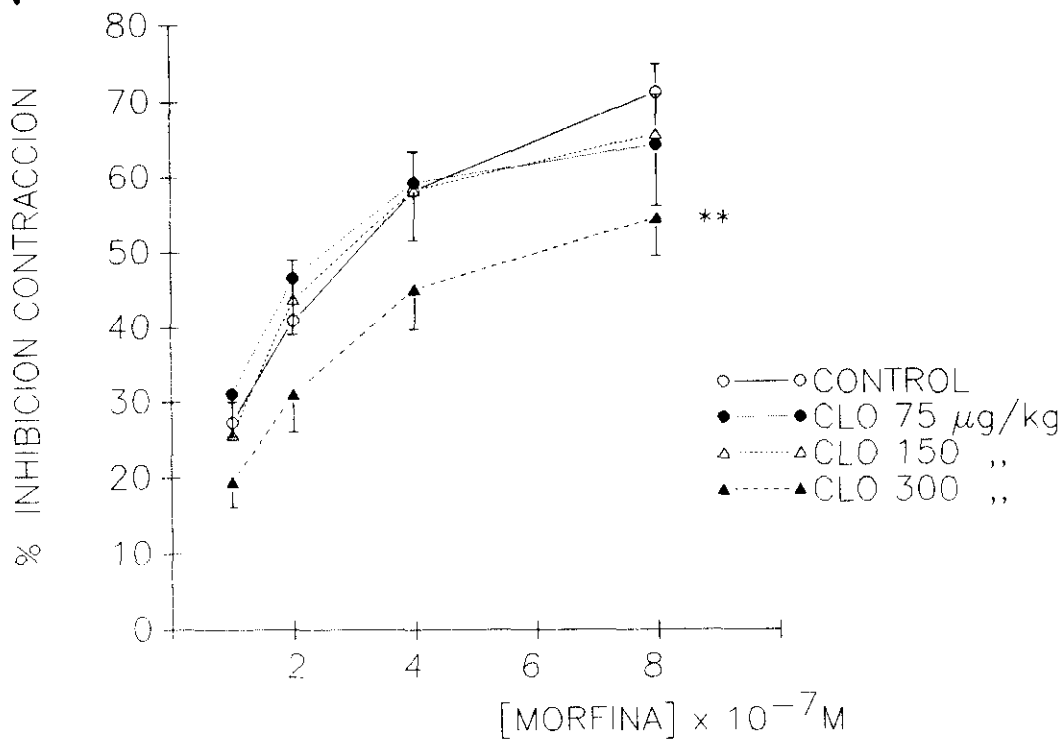
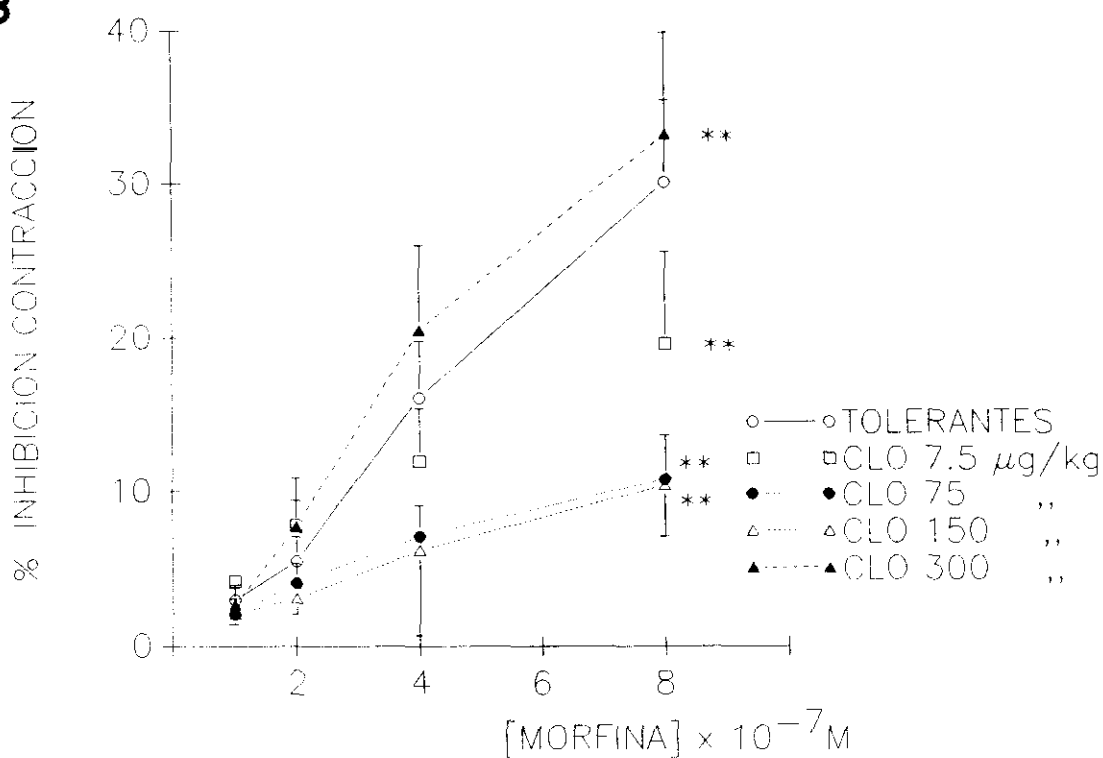
Los valores representan el porcentaje medio de inhibición de la respuesta contráctil  $\pm$  E.S.M., n≥8, \*\*= p<0.01.



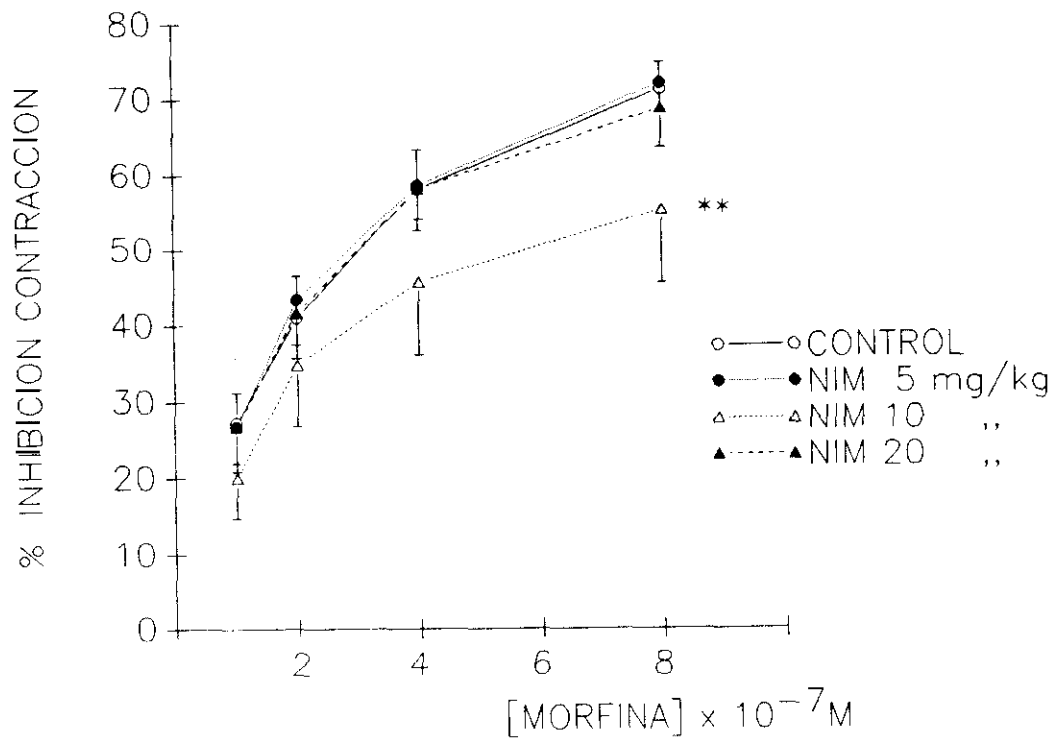
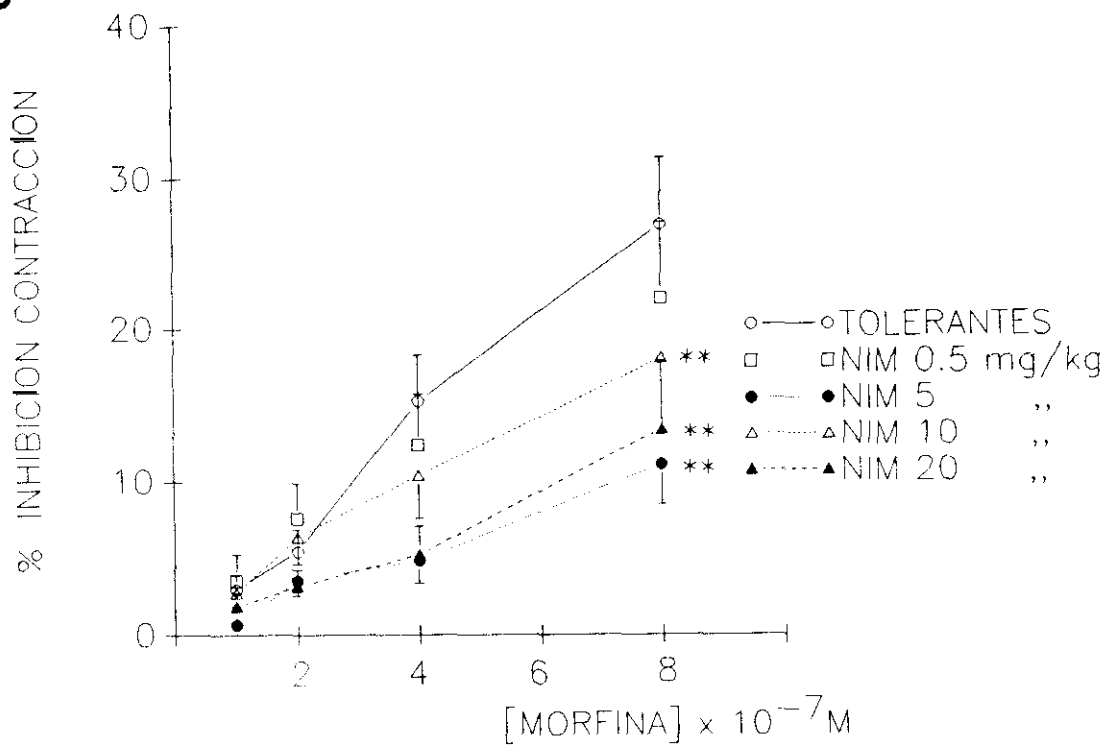
TABLA 12. Efecto de la morfina en preparaciones FL-PM de íleon de cobayo procedentes de animales tolerantes (T) a la morfina y tolerantes tratados con diltiazem i.p. una hora antes del sacrificio.

[MORFINA] (M)	T	DILTIAZEM (mg/kg)			
		1	10 <sup>**</sup>	20 <sup>**</sup>	40
10 <sup>-7</sup>	3.0±0.8	5.2±1.6	5.0±0.9	1.5±1.7	3.4±1.3
2 x10 <sup>-7</sup>	5.5±1.4	8.8±3.0	11.9±4.2	5.8±3.5	6.6±3.7
4 x10 <sup>-7</sup>	15.3±3.0	16.2±4.3	19.4±6.1	11.2±5.5	13.4±3.2
8 x10 <sup>-7</sup>	26.9±4.4	24.8±6.1	32.1±7.0	21.6±7.9	23.6±4.3

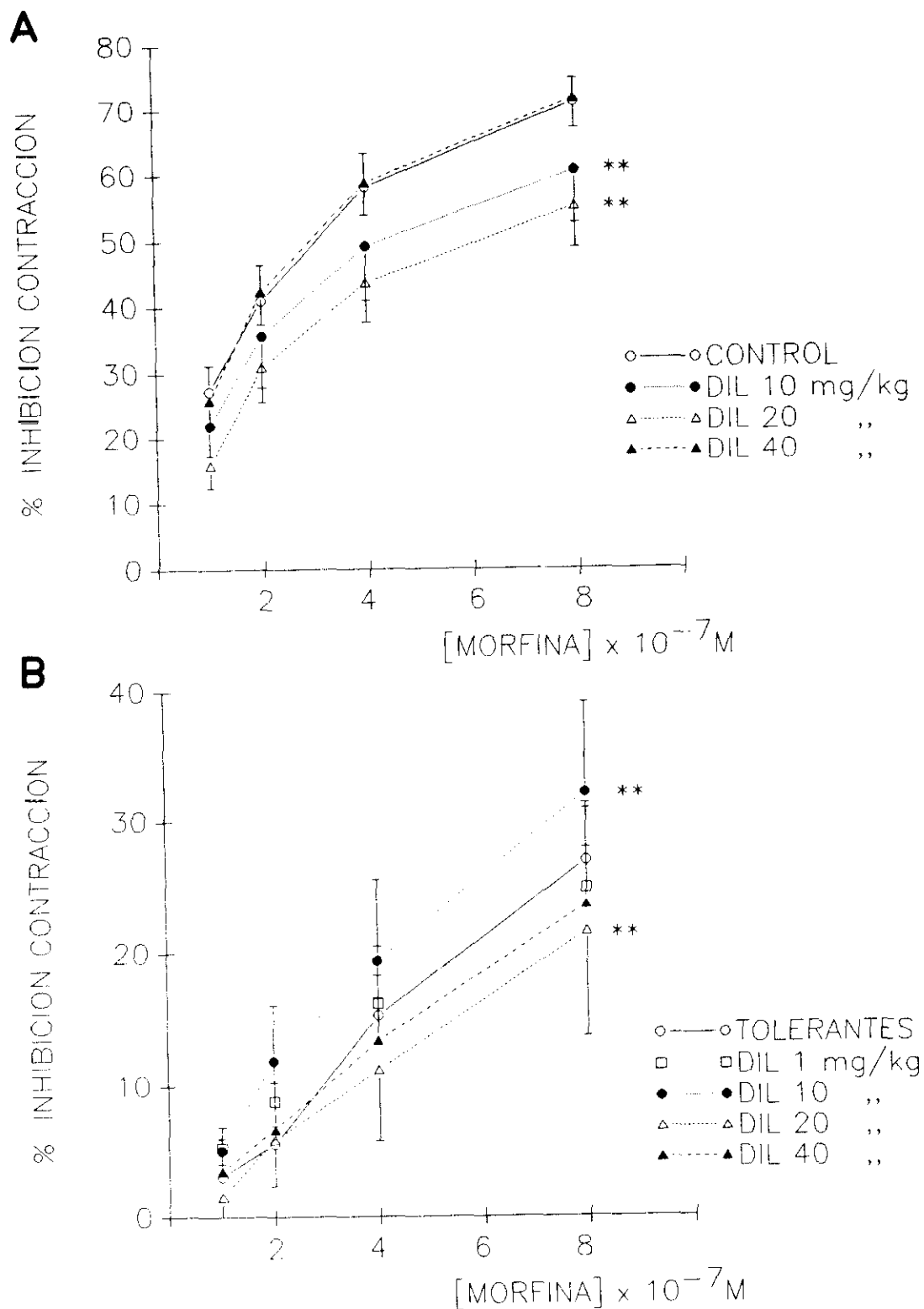
Los valores representan el porcentaje de inhibición medio de la respuesta contráctil ± E.S.M., n≥6, \*\*= p<0.01.

**A****B**

**Figura 14.** Efecto de la morfina en la preparación FL-PM procedente de cobayos control (A) y tratados crónicamente con morfina (B), a los que se les inyectó i.p. diferentes dosis de clonidina (CLO). Cada punto representa el porcentaje de inhibición medio de la contracción y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .

**A****B**

**Figura 15.** Efecto de la morfina en la preparación FL-PM procedente de cobayos control (A) y tratados crónicamente con morfina (B), a los que se les inyectó i.p. diferentes dosis de nimodipino (NIM). Cada punto representa el porcentaje de inhibición medio de la contracción y las barras el E.S.M.,  $n \geq 6$ ,  $** = p < 0.01$ .



**Figura 16.** Efecto de la morfina en la preparación FL-PM procedente de cobayos control (A) y tratados crónicamente con morfina (B), a los que se les inyectó i.p. diferentes dosis de diltiazem (DIL). Cada punto representa el porcentaje de inhibición medio de la contracción y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

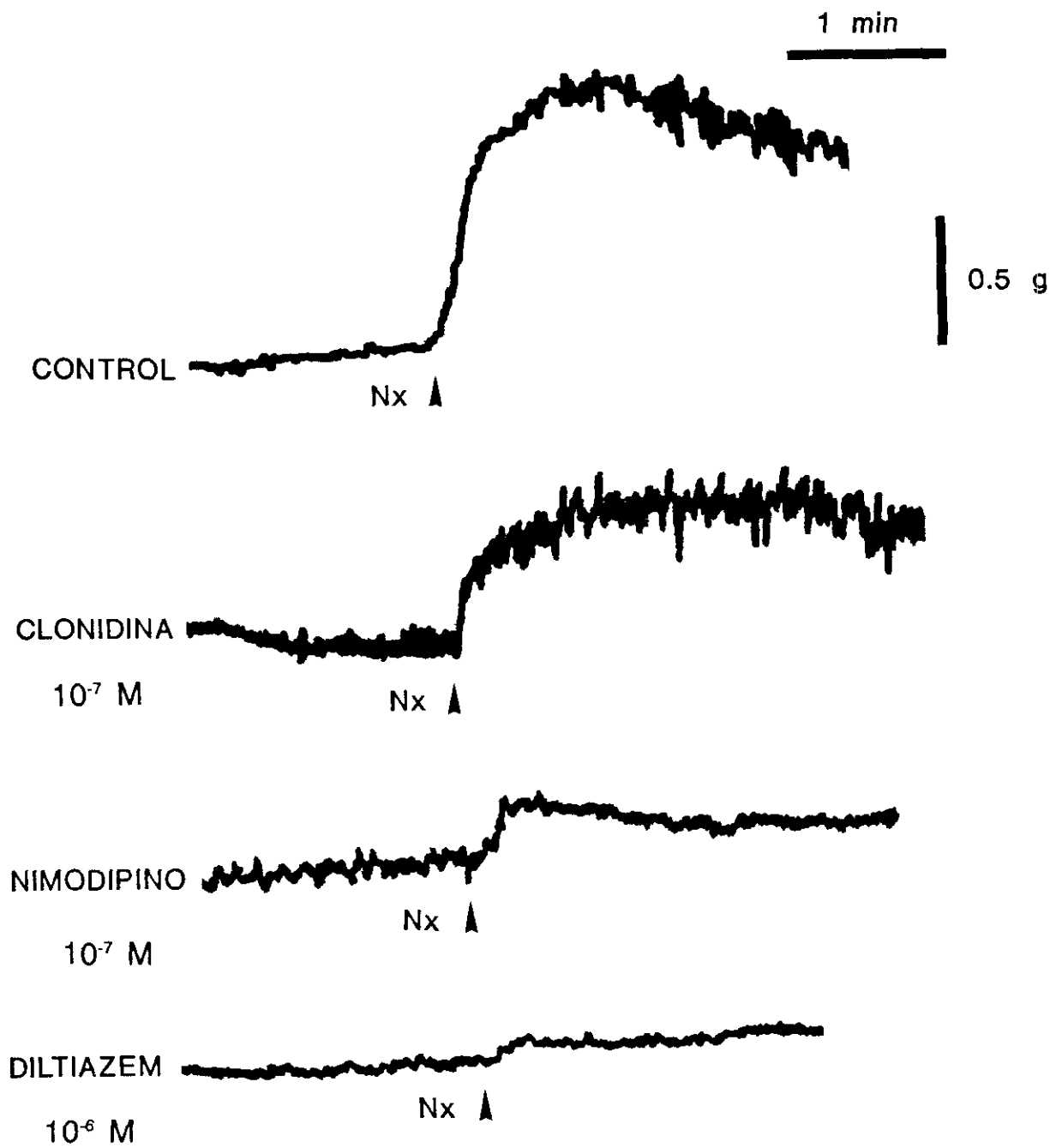
#### 4.1.4. Estudio de la abstinencia inducida por naloxona.

La administración de naloxona ( $10^{-6}$  M) en el baño de órganos no alteró de forma significativa la respuesta contráctil inducida por estímulo eléctrico ni la motilidad basal de las preparaciones FL-PM procedentes de cobayos control.

En las preparaciones procedentes de animales tolerantes a la morfina la administración de naloxona  $10^{-6}$  M en el baño provocó una contractura muscular sostenida. Este fenómeno fue claramente observable en el 54.3 % de los casos ( $n = 35$ ). Cuando las preparaciones procedentes de cobayos tolerantes fueron mantenidas en solución Krebs con morfina  $10^{-7}$  M, se registró la contractura de la preparación en el 74 % de los casos ( $n = 23$ ).

##### 4.1.4.1. Tratamientos *in vitro*.

En la Figura 17 se representan registros obtenidos de la contracción muscular inducida por naloxona en preparaciones FL-PM de íleon de cobayos tratados crónicamente con morfina e incubadas con clonidina, nimodipino y diltiazem.



*Figura 17.* Registros de la contracción inducida por naloxona ( $10^{-6}$  M en preparaciones FL-PM procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina e incubadas durante 15 minutos con clonidina ( $10^{-7}$  M), nimodipino ( $10^{-7}$  M) y diltiazem ( $10^{-6}$  M).

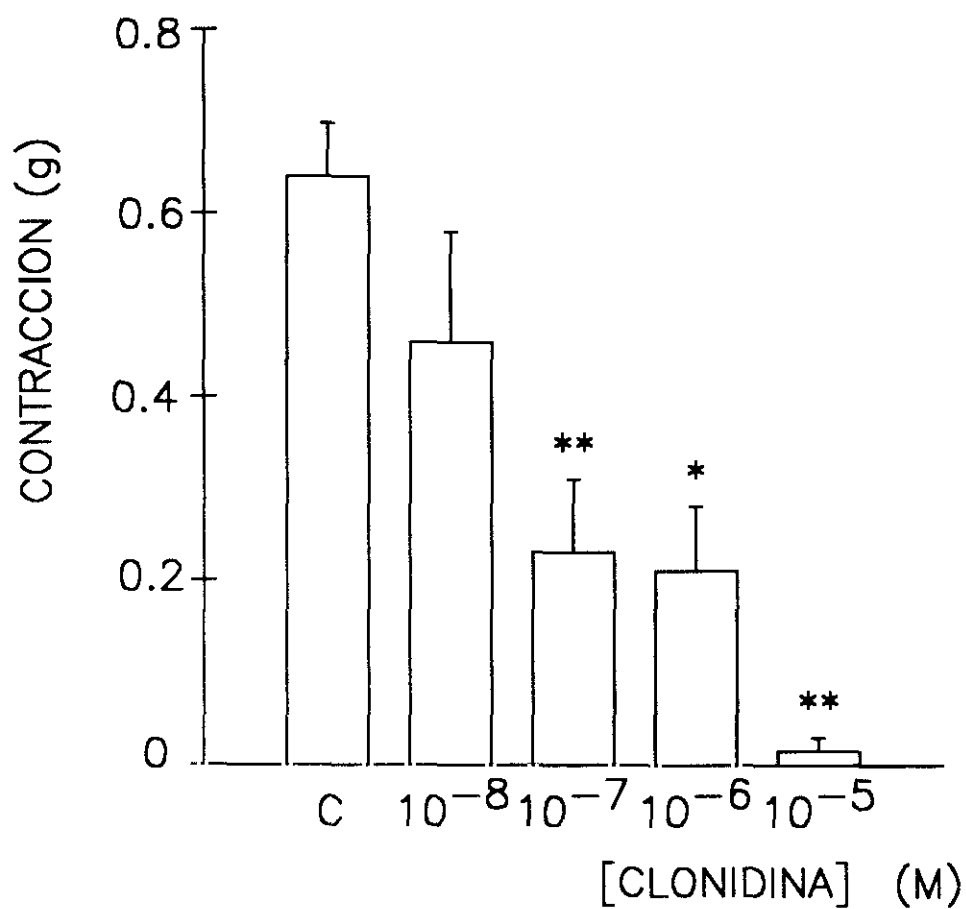
#### 4.1.4.1.1. Efecto de la clonidina sobre la dependencia a la morfina.

La clonidina administrada en el baño de órganos produjo una disminución dosis-dependiente de la fuerza de la contracción inducida por naloxona en la preparación FL-PM procedente de cobayos tratados crónicamente con morfina. Alcanzándose diferencias significativas en los resultados para concentraciones iguales o superiores a  $10^{-7}$  M (Tabla 13, Figura 18).

TABLA 13. Fuerza de la contracción inducida por naloxona en preparaciones FL-PM de íleon procedentes de cobayos tolerantes a morfina después de 15 minutos de incubación con varias concentraciones de clonidina.

[CLONIDINA] (M)	CONTRACCION (g)	N
0	$0.640 \pm 0.058$	9
$10^{-8}$	$0.460 \pm 0.120$	12
$10^{-7}$	$0.230 \pm 0.080^{**}$	15
$10^{-6}$	$0.210 \pm 0.070^{*}$	11
$10^{-5}$	$0.015 \pm 0.015^{**}$	6

Los valores representan la fuerza media de la contracción en gramos  $\pm$  E.S.M., N= número de experiencias, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .



*Figura 18.* Fuerza de la contracción inducida por naloxona  $10^{-6}$ M en preparaciones FL-PM de íleon procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina (200 mg/kg) después de 15 minutos de incubación con distintas concentraciones de clonidina. C= control,  $N \geq 5$ , \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .



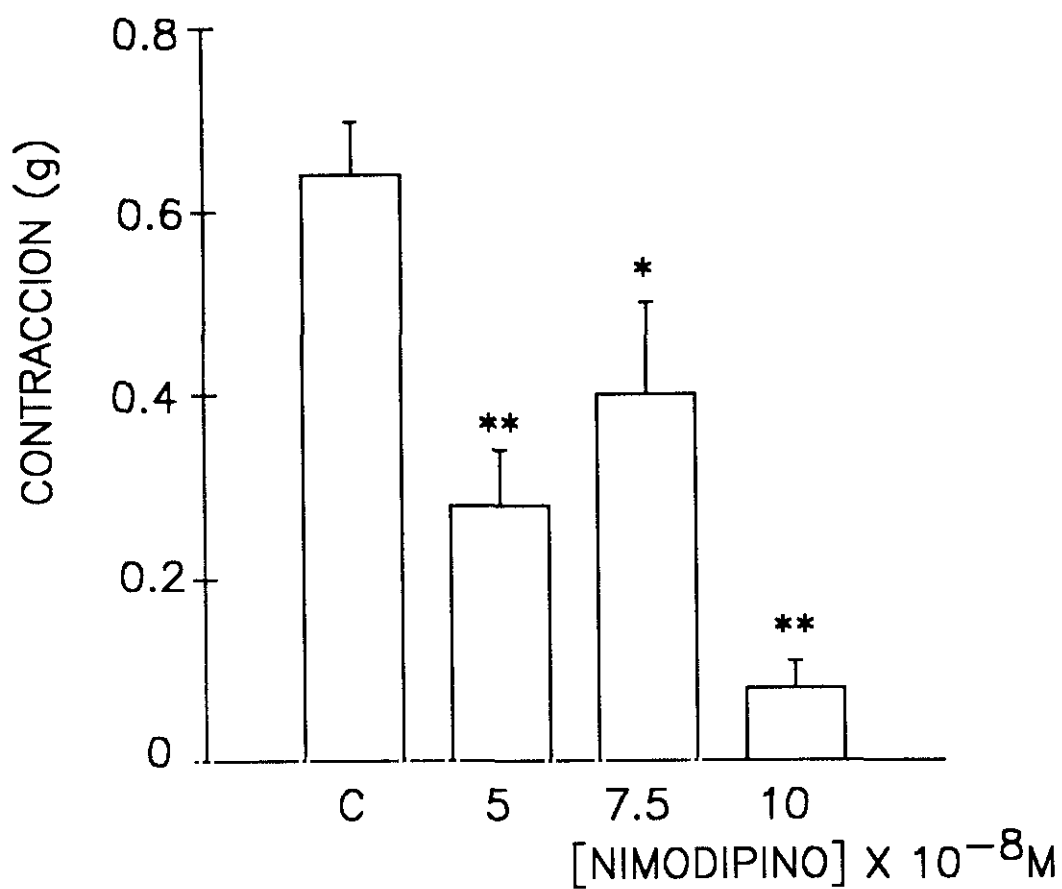
4.1.4.1.2. Efecto del **nimodipino** sobre la dependencia a la morfina.

El nimodipino produjo una disminución dosis-dependiente de la fuerza de la contracción inducida por naloxona en la preparación FL-PM procedente de cobayos tolerantes. Alcanzándose diferencias significativas para concentraciones iguales o superiores a  $5 \times 10^{-8}$  M (Tabla 14, Figura 19).

TABLA 14. Fuerza de la contracción inducida por naloxona en preparaciones FL-PM de íleon procedentes de cobayos tolerantes a morfina después de 15 minutos de incubación con distintas concentraciones de nimodipino.

[NIMODIPINO] (M)	CONTRACCION (g)	N
0	$0.640 \pm 0.058$	9
$5 \times 10^{-8}$	$0.280 \pm 0.060^{**}$	8
$7.5 \times 10^{-8}$	$0.400 \pm 0.100^{*}$	8
$10^{-7}$	$0.080 \pm 0.030^{**}$	9

Los valores representan la fuerza media de la contracción en gramos  $\pm$  E.S.M., N= número de experiencias,  $*$  =  $p < 0.05$ ,  $**$  =  $p < 0.01$ .



*Figura 19.* Fuerza de la contracción inducida por naloxona  $10^{-6}$ M en preparaciones FL-PM de íleon procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina (200 mg/kg) después de 15 minutos de incubación con distintas concentraciones de nimodipino. C= control,  $N \geq 8$ , \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

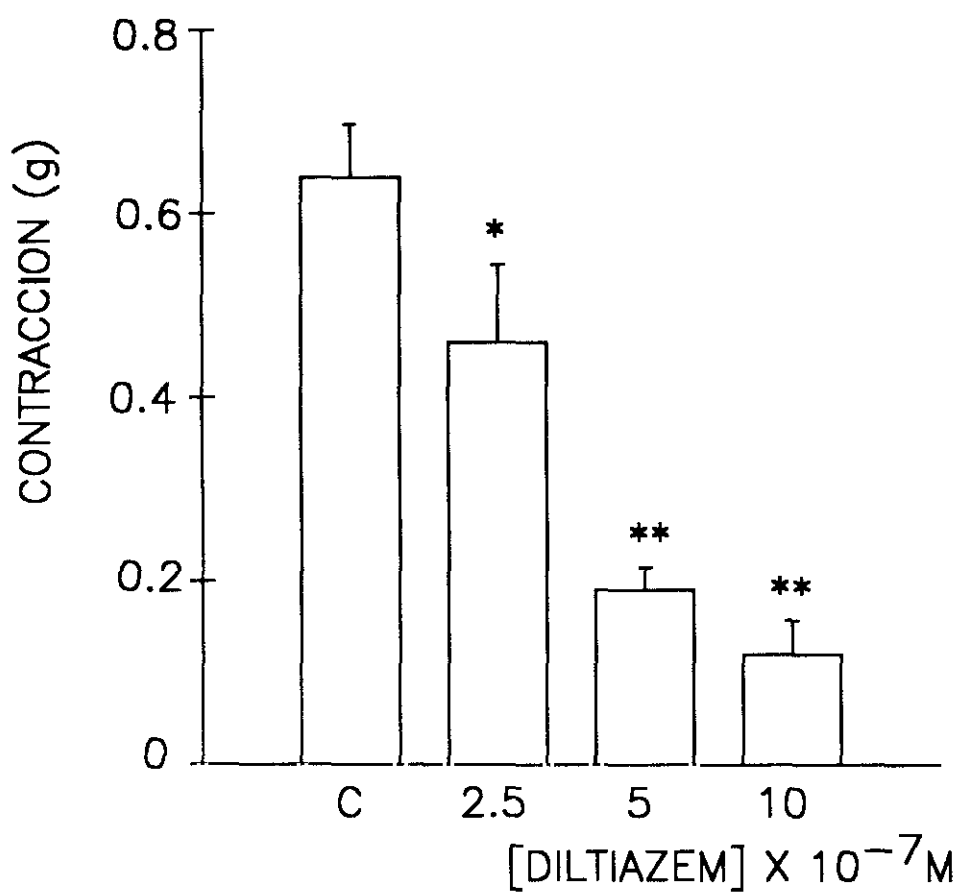
4.1.4.1.3. Efecto del **diltiazem** sobre la dependencia a la morfina.

El diltiazem produjo una disminución dependiente de la dosis, de la fuerza de la contracción inducida por naloxona en la preparación FL-PM procedente de cobayos tolerantes. Alcanzándose diferencias significativas para concentraciones iguales o superiores a  $2.5 \times 10^{-7}$  M (Tabla 15, Figura 20).

TABLA 15. Fuerza de la contracción inducida por naloxona en preparaciones FL-PM de íleon procedentes de cobayos tolerantes a morfina después de 15 min de incubación con distintas concentraciones de diltiazem.

[DILTIAZEM] (M)	CONTRACCION (g)	N
0	$0.640 \pm 0.058$	9
$2.5 \times 10^{-7}$	$0.460 \pm 0.085^*$	7
$5 \times 10^{-7}$	$0.190 \pm 0.025^{**}$	9
$10^{-6}$	$0.120 \pm 0.037^{**}$	10

Los valores representan la fuerza media de la contracción en gramos  $\pm$  E.S.M., N= número de experiencias, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .



*Figura 20.* Fuerza de la contracción inducida por naloxona  $10^{-6}$  M en preparaciones FL-PM de íleon procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina (200 mg/kg) después de 15 minutos de incubación con distintas concentraciones de diltiazem. C= control,  $N \geq 7$ , \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

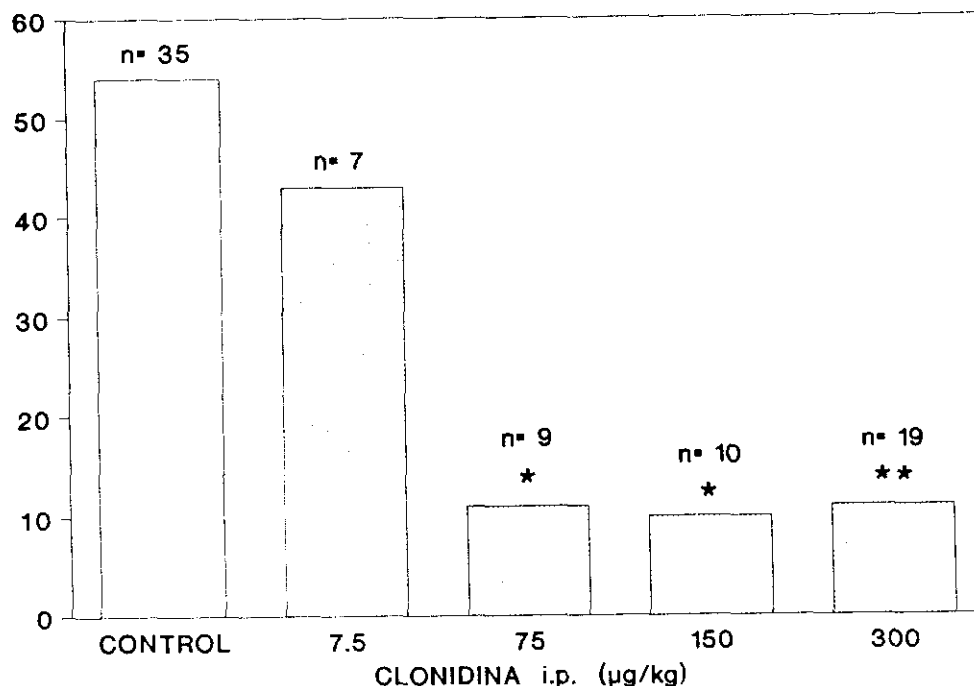
#### 4.1.4.2. Tratamientos *in vivo*.

##### 4.1.4.2.1. Efecto de la **clonidina** sobre la dependencia a la morfina.

En las preparaciones procedentes de animales tolerantes a morfina y tratados i.p. con clonidina (7.5, 75, 150 y 300  $\mu\text{g/kg}$ ) se observó la aparición del síndrome de abstinencia *in vitro* en el 43, 11, 10 y 11 % de los casos, respectivamente. La diferencia respecto a la frecuencia de presentación del síndrome de abstinencia en la preparación FL-PM procedente de animales no tratados con clonidina (54.3 %,  $n = 35$ ) fue estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 4.514$ ;  $\chi^2 = 8.167$ , 1 g.l.) para las dosis de 150 y 300  $\mu\text{g/kg}$  respectivamente (Figura 21). Estos resultados se obtuvieron manteniendo las preparaciones en solución Krebs sin morfina.

La comparación estadística de los resultados de presencia y ausencia del signo de abstinencia en la preparación FL-PM se valoró considerando como hipótesis nula que la presentación del signo de abstinencia es independiente del tratamiento y rechazando dicha hipótesis cuando el valor obtenido de  $\chi^2$  fue mayor que el valor de  $\chi^2$  dado para un nivel de significación de 0.05.

## % PRESENTACION ABSTINENCIA EN FL-PM

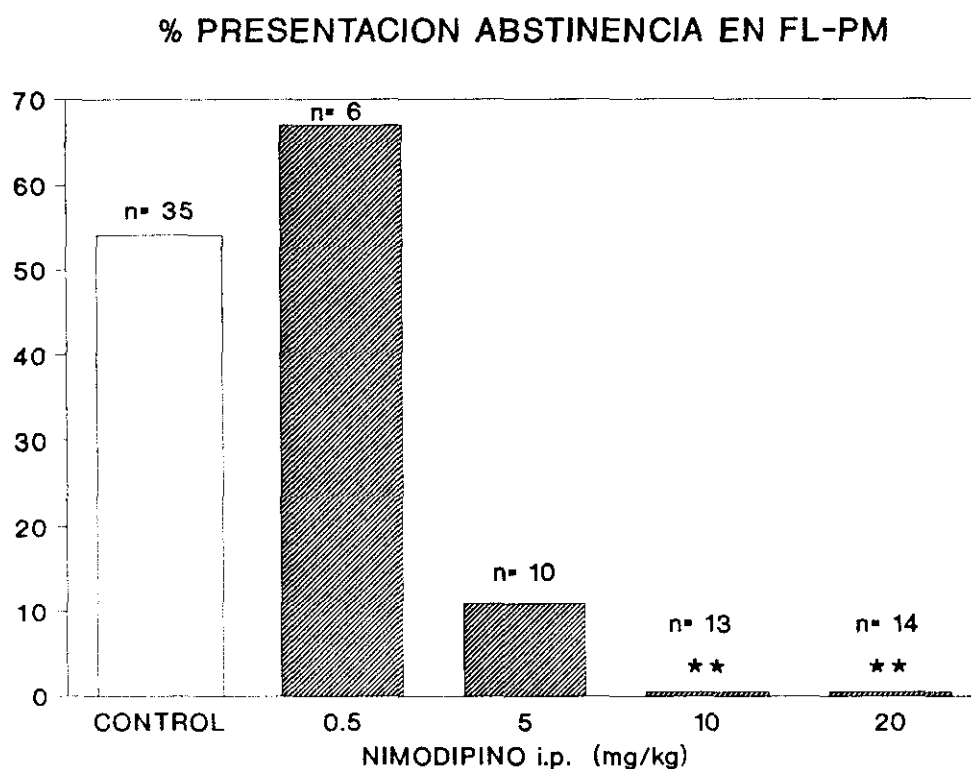


*Figura 21.* Porcentaje de presentación de abstinencia en la preparación FL-PM de íleon procedente de cobayos tolerantes a morfina y tratados i.p. con clonidina a las dosis de 7.5, 75, 150 y 300 µg/kg una hora antes del sacrificio. Las preparaciones fueron incubadas en solución Krebs sin morfina. n= número de experiencias, \*=  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .

#### 4.1.3.1.2. Efecto del nimodipino sobre la dependencia a la morfina.

En las preparaciones procedentes de animales tolerantes y tratados con nimodipino (0.5, 5, 10, 20 mg/kg) se observaron signos de abstinencia en la preparación FL-PM en el 67, 10.5, 0 y 0 % respectivamente. La diferencia con respecto a cobayos

tolerantes no tratados con nimodipino fue estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 9.521$ ;  $\chi^2 = 10.232$ , 1 g.l.) para las dosis de 10 y 20 mg/kg respectivamente (Figura 22).

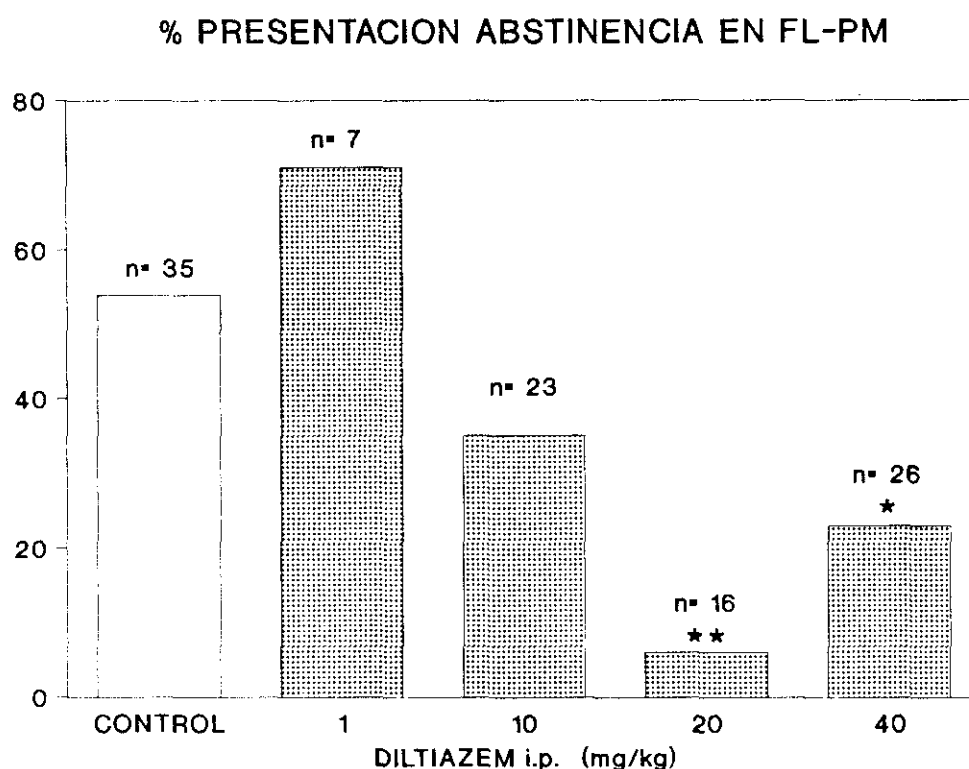


*Figura 22.* Porcentaje de presentación de abstinencia en preparaciones FL-PM de ileon de cobayo procedentes de animales tolerantes a morfina tratados i.p. con nimodipino a las dosis de 0.5, 5, 10, 20 una hora antes del sacrificio. Las preparaciones fueron incubadas en solución Krebs sin morfina. n= número de experiencias, \*\*=  $p < 0.01$ .

#### 4.1.4.1.3. Efecto del **diltiazem** sobre la dependencia a la morfina.

En las preparaciones procedentes de animales tolerantes a morfina y tratados

con diltiazem i.p. (1, 10, 20 y 40 mg/kg) se observó la presentación de la contractura muscular tras la adición de naloxona al baño de órganos en un 71, 35.3, 6.2 y 23%, respectivamente de los casos. La diferencia respecto a preparaciones procedentes de cobayos tolerantes no tratados con diltiazem fue estadísticamente significativa ( $\chi^2 = 8.709$ ;  $\chi^2 = 4.786$ , 1 g.l.) para las dosis de 20 y 40 mg/kg respectivamente (Figura 23).



*Figura 23.* Porcentaje de presentación del síndrome de abstinencia en preparaciones FL-PM de íleon de cobayo procedentes de animales tolerantes a morfina tratados i.p. con diltiazem a las dosis de 1, 10, 20 y 40 mg/kg una hora antes del sacrificio. Las preparaciones fueron incubadas en solución Krebs sin morfina. n= número de experiencias, \* =  $p < 0.05$ , \*\* =  $p < 0.01$ .



#### 4.1.5. Estudio de la abstinencia inducida por retirada del depósito de morfina.

La retirada del depósito subcutáneo de morfina al tercer día no desencadenó una sintomatología de abstinencia clara en los cobayos, únicamente, se evidenció un aumento de la agresividad y cierto grado de hiperexcitabilidad.

La sensibilidad a la morfina de las preparaciones FL-PM procedentes de estos animales y valorada a distintos tiempos (12, 24, 48 y 72 h) no siguió un patrón de recuperación constante por lo que no ha podido valorarse.

#### 4.2. VALORACION DE LOS SIGNOS DE ABSTINENCIA A LA MORFINA EN RATA.

- Ratas control.

El grupo control de animales no presentó ninguno de los signos característicos del síndrome de abstinencia después del tratamiento con naloxona. El tratamiento con la clonidina, el nimodipino y el diltiazem tampoco provocó ninguno de los signos de abstinencia en este grupo.

- Ratas en abstinencia.

Las ratas tratadas crónicamente con morfina a las que se les desencadenó un síndrome de abstinencia por inyección de naloxona i.p. (1 mg/kg) al tercer día, presentaron distintos signos típicos del síndrome de abstinencia. Aquellos que se presentaron de forma frecuente (aseo, castañeteo de dientes, pérdida de peso, sacudidas y saltos) se cuantificaron calculando la media y su error estándar.

También se registraron otros signos de abstinencia (cromodacriorrea, diarrea, extensión abdominal, ptosis palpebral y vocalización) que resultaron difíciles de cuantificar y que fueron considerados de carácter cualitativo, valorándose su presencia o ausencia.

Los resultados obtenidos para el grupo de signos cuantificables se recogen en la Tabla 16.

Los signos considerados cualitativos mostraron los siguientes porcentajes de presentación en el grupo de ratas en abstinencia: cromodacriorrea (8 %), diarrea (75 %), extensión abdominal (50 %), ptosis palpebral (92 %) y vocalización (42 %).

Se observó diarrea en el 13 % de los animales tratados con clonidina ( $\chi^2 = 8.889$ , 1 g.l.); en el 14 % de los tratados con nimodipino ( $\chi^2 = 7.521$ , 1 g.l.) y en el 17 % de los tratados con diltiazem ( $\chi^2 = 6.075$ , 1 g.l.).

Sólo el diltiazem redujo la presentación de extensión abdominal a un 0.5 % ( $\chi^2 = 4.688$ , 1 g.l.).

La ptosis palpebral se presentó en un 0.5 % después de la administración de clonidina ( $\chi^2 = 20.881$ , 1 g.l.).

Las vocalizaciones se presentaron en un 0.5 % después del tratamiento con nimodipino ( $\chi^2 = 3.983$ , 1 g.l.) y diltiazem ( $\chi^2 = 4.018$ , 1 g.l.).

Como resumen podemos decir que tanto la clonidina (0.3 mg/kg) como el nimodipino (10 mg/kg) y el diltiazem (20 mg/kg) redujeron de forma significativa la presentación de aseo, castañeteo de dientes, diarrea y sacudidas. Sin embargo no modificaron la pérdida de peso, a excepción de la clonidina.

Tampoco modificaron la presentación de cromodaciorrea ni de saltos. La aparición de ptosis palpebral sólo fue reducida por la clonidina. El diltiazem disminuyó la presentación de extensión abdominal. La Tabla 17 muestra una sinopsis de los resultados referentes al comportamiento.

TABLA 16. Efecto de la clonidina (0.3 mg/kg), el nimodipino (10 mg/kg) y el diltiazem (20 mg/kg) sobre la presentación de **aseo**, **castañeteo de dientes**, **perdida de peso**, **sacudidas** y **saltos** durante 30 minutos de observación del síndrome de abstinencia (S.A.) desencadenado por 1 mg/kg de naloxona i.p. en la rata.

PARAMETROS	S.A.	CLONIDINA	NIMODIPINO	DILTIAZEM
ASEO	9.0 ± 2.5	1.0 ± 0.6*	2.0 ± 1.2*	3.0 ± 1.1*
CASTAÑETEO	16.2 ± 4.0	3.8 ± 1.6*	3.3 ± 1.1*	3.5 ± 1.1*
PERDIDA DE PESO (g)	9.0 ± 1.2	4.7 ± 0.5*	8.9 ± 2.1	6.2 ± 2.4
SACUDIDAS	13.8 ± 3.8	0*	7.0 ± 2.8*	4.0 ± 1.6*
SALTOS	1.5 ± 0.8	5.0 ± 2.7	0.9 ± 0.9	4.7 ± 3.0

Los datos indican la media del número de presentaciones ± E.S.M., n≥6, \* = p<0.05.

TABLA 17. Efecto de la clonidina (0.3 mg/kg) el nimodipino (10 mg/kg) y el diltiazem (20 mg/kg) sobre la presentación de los signos característicos del síndrome de abstinencia en ratas tratadas crónicamente con morfina 200 mg/kg s.c. y a las que se les desencadenó un síndrome de abstinencia por inyección i.p. de naloxona (1 mg/kg) al tercer día.

PARAMETROS	CLONIDINA	NIMODIPINO	DILTIAZEM
ASEO	↓	↓	↓
CASTEÑETO DIENTES	↓	↓	↓
CROMODACRIORREA	0	0	0
DIARREA	↓↓	↓↓	↓
EXTENSION ABDOMINAL	↓↓	↓↓	↓
PERDIDA DE PESO	0	0	0
PTOSIS PALPEBRAL	↓↓↓	0	0
SACUDIDAS	↓	↓	↓
SALTO	0	0	0
VOCALIZACION	0	↓	↓

0= no modificación, ↓ = disminución con  $p < 0.05$ , ↓↓ = disminución con  $p < 0.01$ ,  
 ↓↓↓ = disminución con  $p < 0.001$ ,  $n \geq 6$ .

#### 4.3. NIVELES DE MONOAMINAS EN SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE RATA.

##### 4.3.1. Niveles de 5-hidroxitriptamina y ácido 5-hidroxiindolacético.

Se valoraron los niveles de 5-hidroxitriptamina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y el cociente 5-HIAA/5-HT como un índice de la velocidad de recambio de 5-HT.

Los niveles de 5-HT no se modificaron, con respecto a los controles, ni en los animales tolerantes ni en los animales en síndrome de abstinencia. Los niveles de 5-HIAA no se modificaron con el establecimiento de tolerancia a la morfina pero sí lo hicieron durante el síndrome de abstinencia en el bulbo y en el hipocampo, donde aumentaron con respecto a los controles. El índice 5-HIAA/5-HT aumentó en los animales tolerantes sólo en la corteza, mientras que en los animales en síndrome de abstinencia aumentó en bulbo, corteza y médula espinal.

##### **BULBO.**

- *Ratas control (Figura 24).*

Las ratas control presentaron unos niveles de 5-HT de  $845 \pm 49.9$  y de 5-HIAA de  $315 \pm 17.1$  ng/g de tejido,  $n = 8$ .

La clonidina (0.3 mg/kg) y el nimodipino (10 mg/kg) aumentaron los niveles de 5-HT de forma significativa.

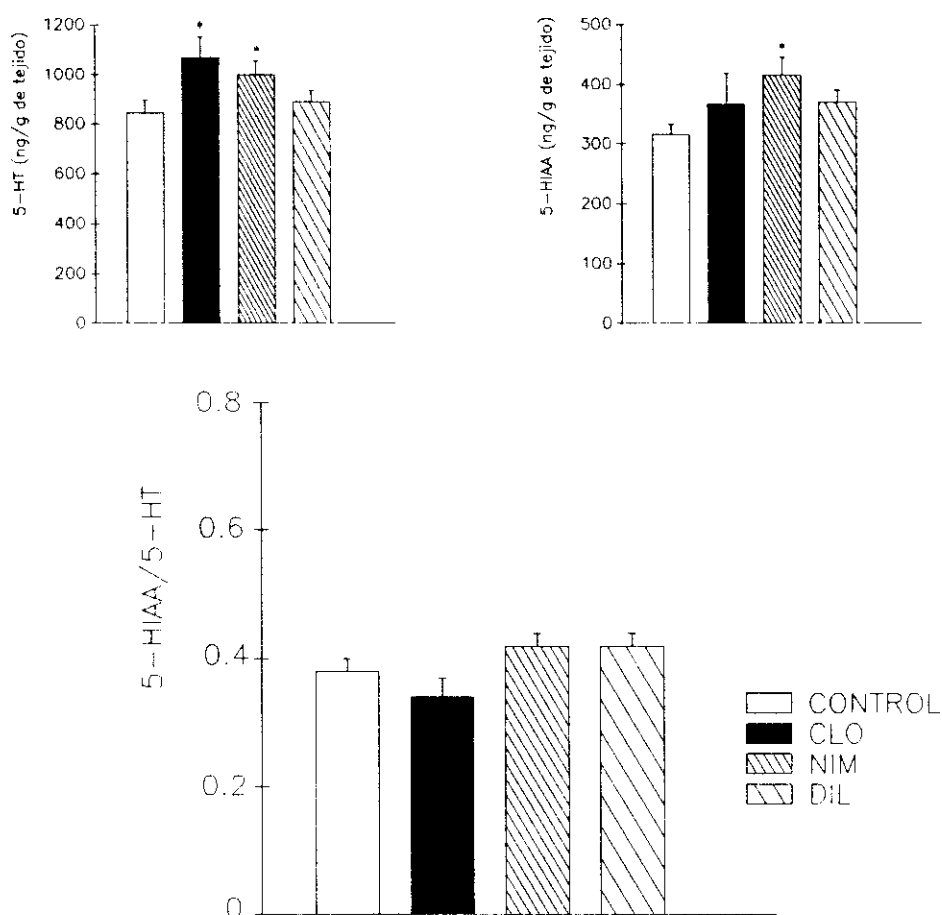
El nimodipino aumentó de forma significativa los niveles de 5-HIAA.

- *Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 25).*

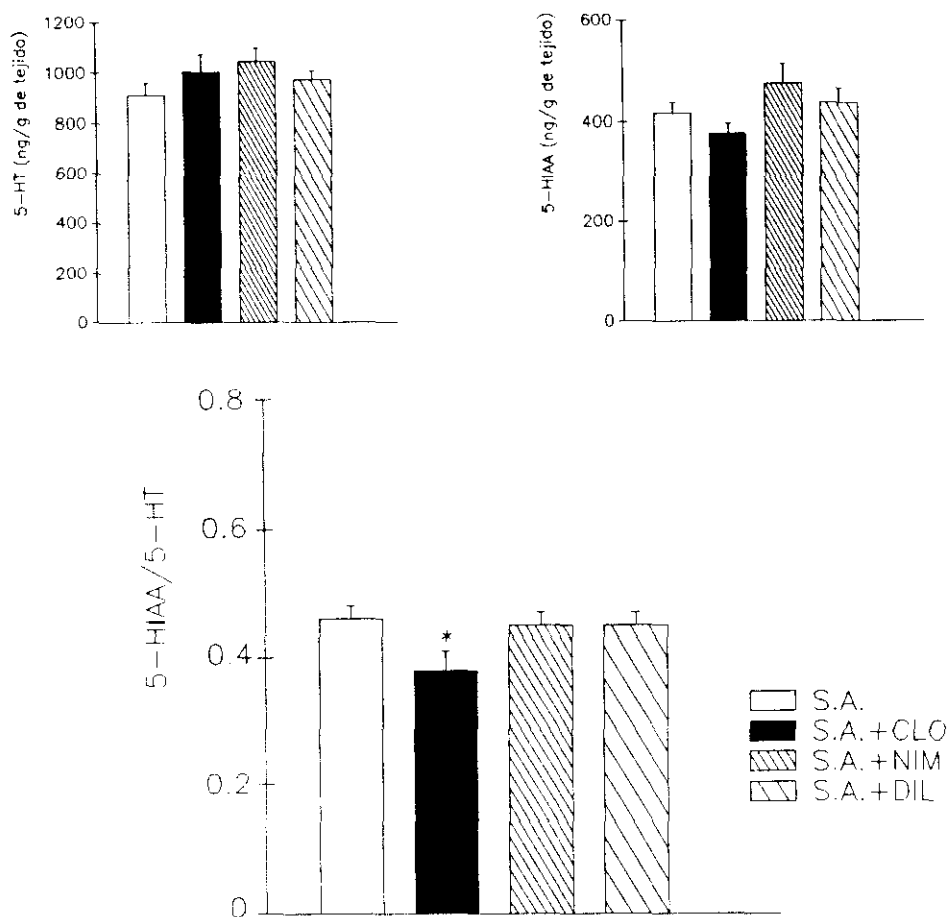
Las ratas en síndrome de abstinencia presentaron unos niveles de 5-HT de  $912 \pm 47.6$  y de 5-HIAA de  $417 \pm 20.1$  ng/g de tejido,  $n = 11$ .

La clonidina, el nimodipino y el diltiazem no produjeron variaciones significativas en los niveles de 5-HT ni de 5-HIAA en las ratas a las que se les desencadenó un síndrome de abstinencia con naloxona comparándolos con los niveles de las ratas en síndrome de abstinencia.

Sólo la clonidina disminuyó de forma significativa el cociente 5-HIAA/5-HT.



**Figura 24.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en el bulbo de ratas control tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .



**Figura 25.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en el **bulbo** de ratas en síndrome de abstinencia (S.A.) y tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .

## **CORTEZA**

- Ratas control (Figura 26).

Las ratas control presentaron unos niveles de 5-HT de  $517 \pm 45.2$  y de 5-HIAA de  $205 \pm 20.6$  ng/g de tejido,  $n = 6$ .

El nimodipino y el diltiazem disminuyeron los niveles de 5-HT de forma significativa.

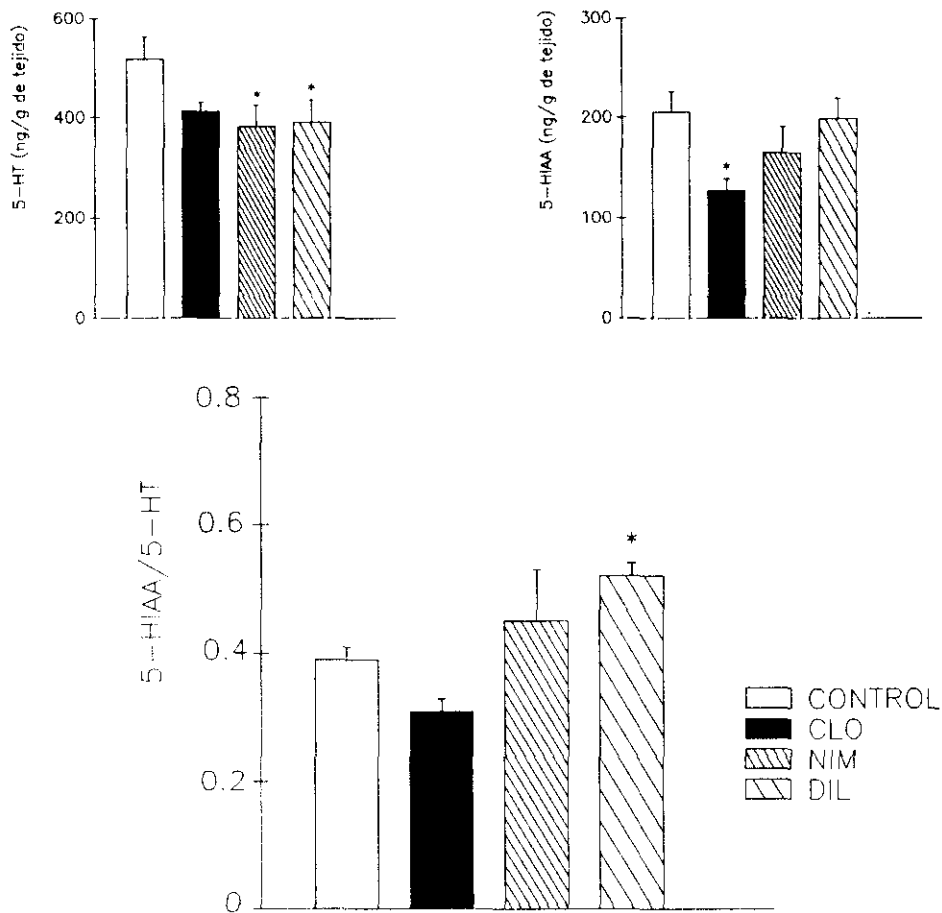
La clonidina disminuyó de forma significativa los niveles de 5-HIAA.

El recambio de 5-HT aumentó de forma significativa en las ratas tratadas con diltiazem.

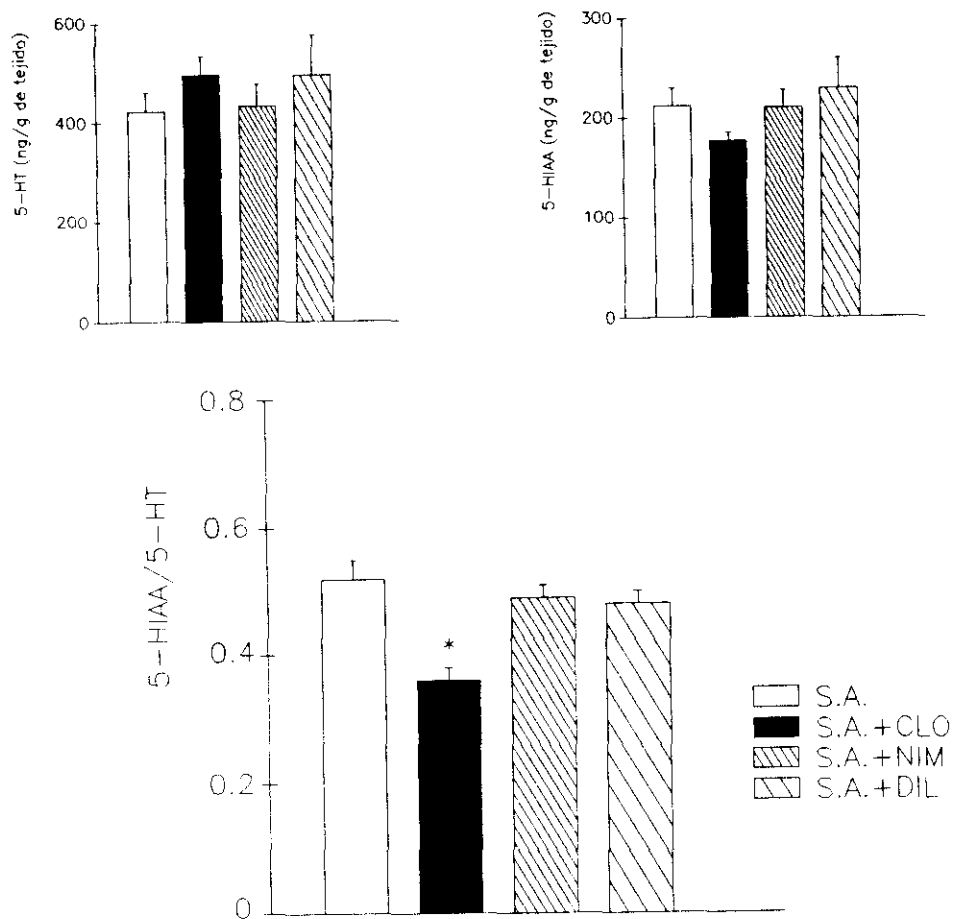
- Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 27).

Las ratas en abstinencia presentaron unos niveles de 5-HT de  $422 \pm 38.7$  y de 5-HIAA de  $212 \pm 17.9$  ng/g de tejido,  $n = 12$ . Ninguno de los fármacos empleados modificó los niveles de 5-HT ni de 5-HIAA. El recambio de 5-HT disminuyó de forma significativa en las ratas tratadas con clonidina.





**Figura 26.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en la **corteza** de ratas control tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .



**Figura 27.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en la **corteza** de ratas en síndrome de abstinencia (S.A.) y tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300 µg/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$

## HIPOCAMPO.

- Ratas control (Figura 28).

Las ratas control presentaron unos niveles de 5-HT de  $408 \pm 31.7$  y de 5-HIAA de  $199 \pm 15.5$  ng/g de tejido,  $n = 7$ .

El diltiazem aumentó de forma significativa los niveles de 5-HT.

En cuanto a los niveles de 5-HIAA, el nimodipino y el diltiazem los aumentaron de forma significativa.

El cociente 5-HIAA/5-HT no resultó modificado de forma significativa por ninguno de los tratamientos.

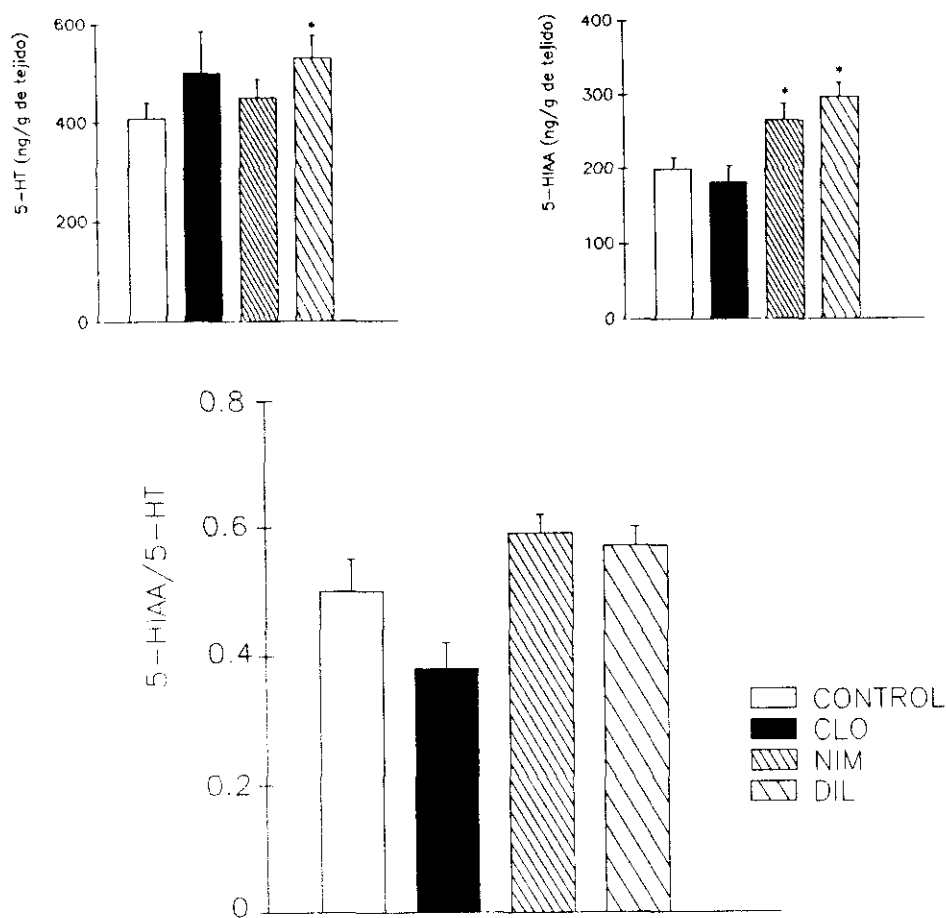
- Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 29).

Las ratas en abstinencia presentaron unos niveles de 5-HT de  $475 \pm 26$  y de 5-HIAA de  $295 \pm 14$  ng/g de tejido,  $n = 11$ .

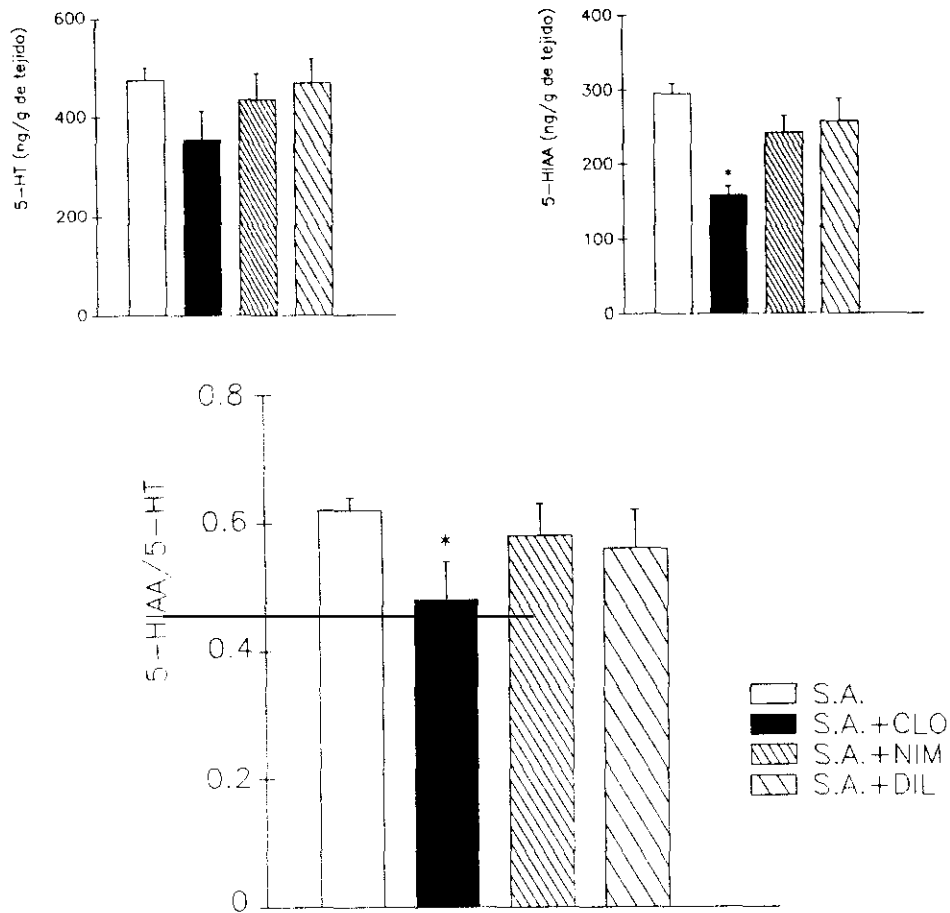
Ninguno de los tratamientos modificó de forma significativa los niveles de 5-HT.

La clonidina disminuyó significativamente los niveles de 5-HIAA.

El recambio de 5-HT disminuyó significativamente después del tratamiento de las ratas con clonidina.



*Figura 28.* Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en el **hipocampo** de ratas control tratadas i.p. con clonidina (300  $\mu$ g/kg), nimodipino (10 mg/kg) y diltiazem (20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .



**Figura 29.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en el **hipocampo** de ratas en síndrome de abstinencia (S.A.) y tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .

## **MESENCEFALO.**

- **Ratas control (Figura 30).**

Las ratas control presentaron unos niveles de 5-HT de  $1253 \pm 70.9$  y de 5-HIAA de  $536 \pm 24.7$  ng/g de tejido,  $n = 7$ .

Ninguno de los fármacos empleados modificó de forma significativa los niveles de 5-HT.

El diltiazem aumentó de forma significativa los niveles de 5-HIAA.

La clonidina disminuyó de forma significativa el recambio de 5-HT mientras que el nimodipino y el diltiazem lo aumentaron.

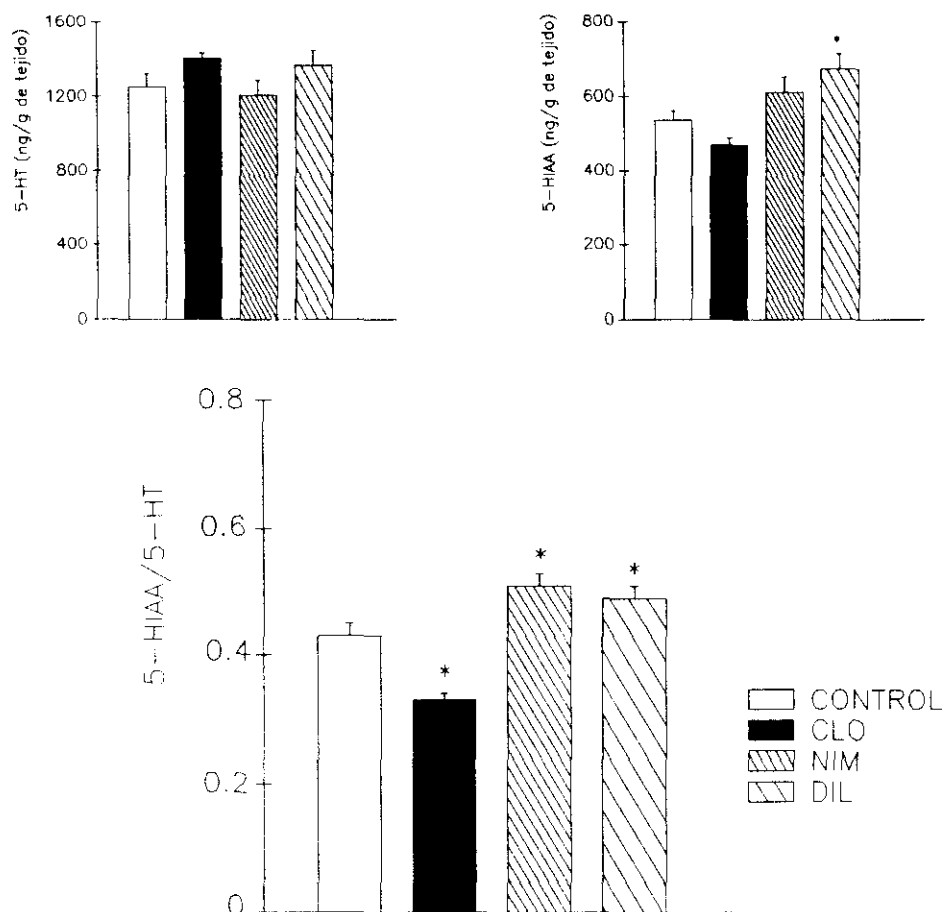
- **Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 31).**

Las ratas en abstinencia presentaron unos niveles de 5-HT de  $1340 \pm 64.4$  y de 5-HIAA de  $619 \pm 18.6$  ng/g de tejido,  $n = 12$ .

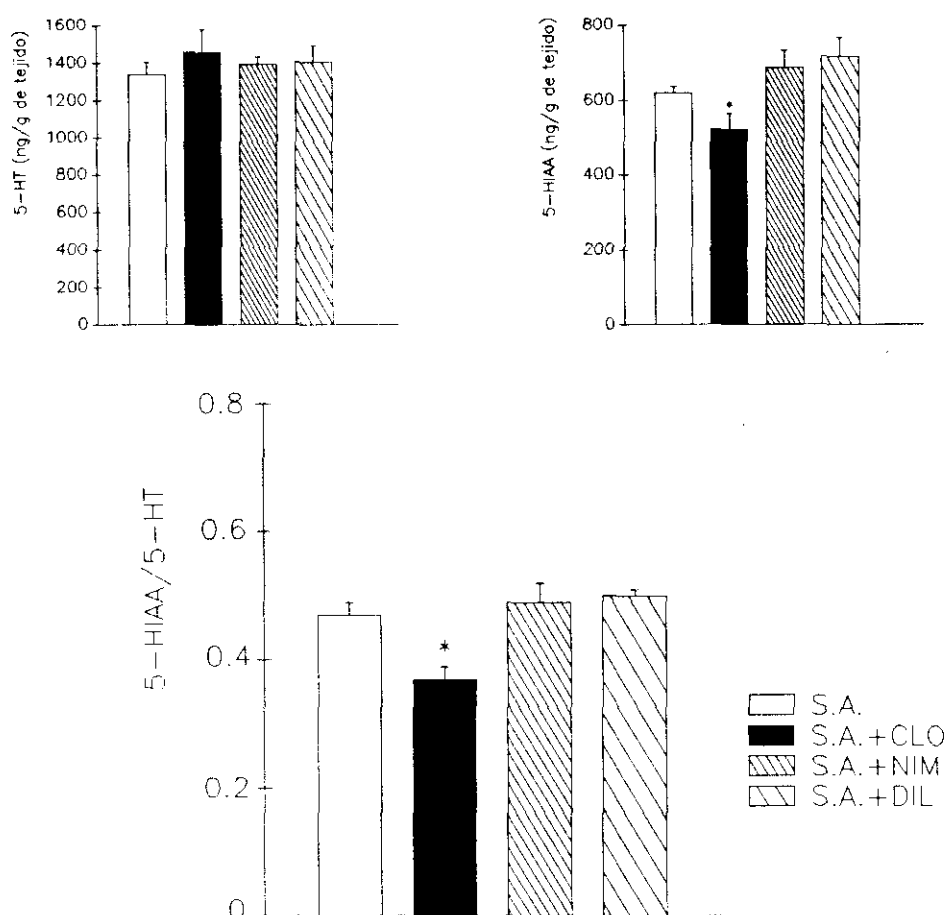
Ninguno de los tratamientos modificó de forma significativa los niveles de 5-HT.

La clonidina disminuyó de forma significativa los niveles de 5-HIAA.

El recambio de 5-HT disminuyó después del tratamiento con clonidina siendo las diferencias significativas con respecto al grupo de ratas en síndrome de abstinencia.



**Figura 30.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en el **mesencéfalo** de ratas control tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio y a las que se les inyectó i.p. naloxona (1 mg/kg). Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .



**Figura 31.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en el **mesencéfalo** de ratas en síndrome de abstinencia (S.A.) y tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$ .



## MEDULA ESPINAL

- Ratas control (Figura 32).

Las ratas control presentaron unos niveles de 5-HT y de 5-HIAA de  $987 \pm 76.6$  y  $167 \pm 10.9$  ng/g de tejido respectivamente,  $n = 8$ .

Ninguno de los fármacos empleados modificó de forma significativa los niveles de 5-HT ni los de 5-HIAA ni el cociente 5-HIAA/5-HT.

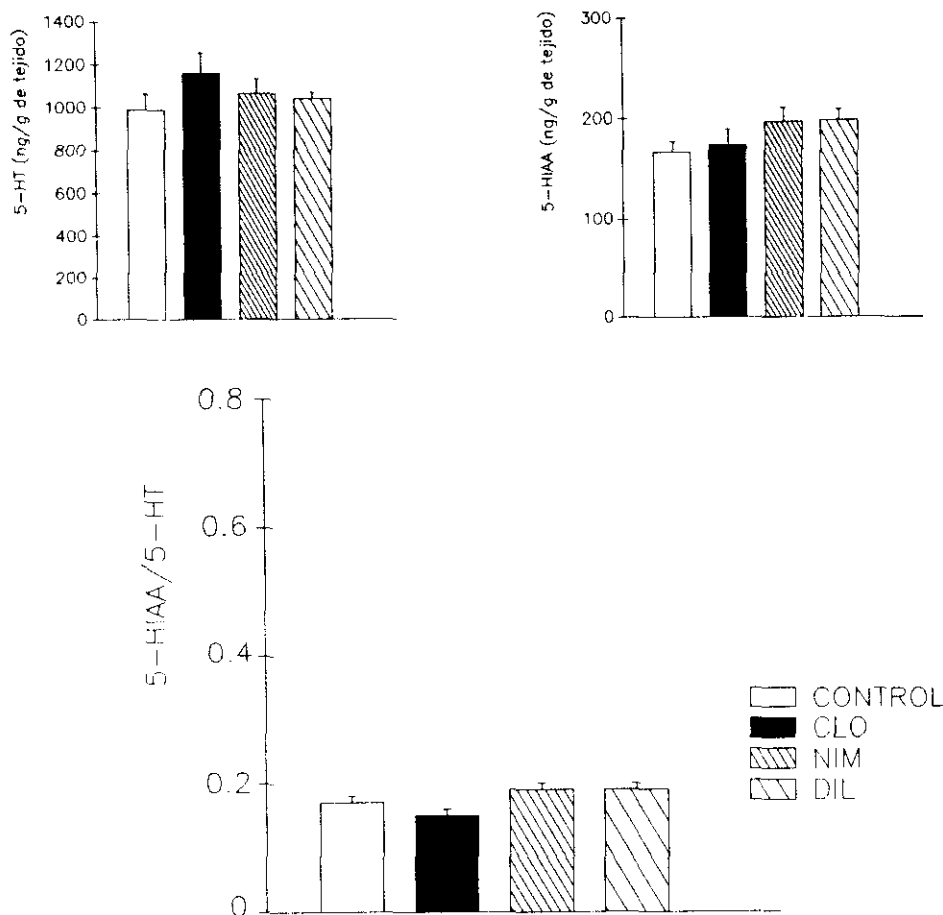
- Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 33).

Las ratas en abstinencia presentaron unos niveles de 5-HT y de 5-HIAA de  $978 \pm 94.8$  y  $200 \pm 17.4$  ng/g de tejido respectivamente,  $n = 7$ .

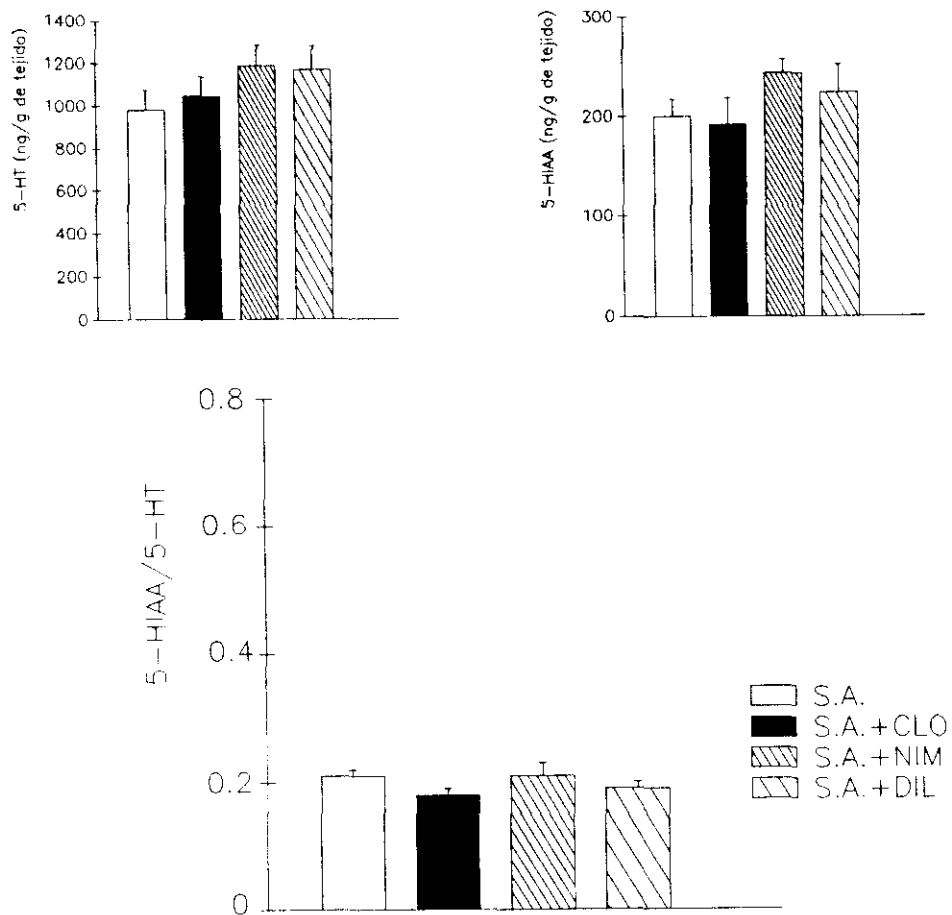
Ninguno de los tratamientos modificó de forma significativa los niveles de 5-HT.

Tampoco hubo modificaciones significativas para el caso del 5-HIAA.

El recambio de 5-HT no se modificó significativamente por los diferentes fármacos empleados.



*Figura 32.* Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en la **médula espinal** de ratas control tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ .



**Figura 33.** Niveles de 5-HT, 5-HIAA (ng/g de tejido) y cociente 5-HIAA/5-HT en la **médula espinal** de ratas en síndrome de abstinencia (S.A.) y tratadas i.p. con clonidina (CLO, 300  $\mu$ g/kg), nimodipino (NIM, 10 mg/kg) y diltiazem (DIL, 20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras verticales el E.S.M.,  $n \geq 6$ .

#### 4.3.2. Niveles de noradrenalina.

Los niveles de NA no se modificaron en ninguna de las estructuras por el tratamiento crónico con morfina, ni por la inducción de síndrome de abstinencia con naloxona. Unicamente en el hipocampo aumentaron dichos niveles tras la inducción del síndrome.

#### **BULBO.**

- Ratas control (Figura 34).

Las ratas control presentaron unos niveles de NA de  $842 \pm 56.5$  ng/g de tejido,  $n = 7$ . La inyección i.p de naloxona no modificó significativamente los niveles de NA.

El nimodipino aumentó de forma significativa dichos niveles.

- Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 35).

Las ratas en síndrome de abstinencia presentaron unos niveles de NA de  $922 \pm 95.2$  ng/g de tejido,  $n = 10$ .

La clonidina, el nimodipino y el diltiazem no produjeron variaciones significativas en los niveles de NA.

#### **CORTEZA.**

- Ratas control (Figura 34).

Las ratas control presentaron unos niveles de NA de  $1024 \pm 68.1$  ng/g de tejido,

n= 7. La clonidina aumentó dichos niveles de forma significativa.

- Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 35).

Las ratas en síndrome de abstinencia presentaron unos niveles de NA de  $1333 \pm 87.6$  ng/g de tejido, n= 10.

La clonidina aumentó de forma significativa los niveles de NA en corteza.

## **HIPOCAMPO.**

- Ratas control (Figura 34).

Las ratas presentaron unos niveles de NA de  $518 \pm 35.9$  ng/g de tejido, n= 8. La clonidina aumentó significativamente los niveles de NA. El nimodipino y el diltiazem no modificaron de forma significativa los niveles de NA.

- Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 35).

Las ratas en abstinencia presentaron unos niveles de NA de  $707 \pm 26.3$  ng/g de tejido, n= 11. El nimodipino y el diltiazem disminuyeron de forma significativa los niveles de NA.

## **MESENCEFALO.**

- Ratas control (Figura 34).

Las ratas control presentaron unos niveles de NA de  $878 \pm 68.9$  ng/g de tejido,  $n = 8$ . En esta estructura, no se modificaron los niveles de NA con ninguno de los fármacos empleados.

- Ratas en abstinencia (Figura 35).

Las ratas en abstinencia presentaron unos niveles de NA de  $757 \pm 36.1$  ng/g de tejido,  $n = 8$ . El nimodipino aumentó de forma significativa dichos niveles.

## **MEDULA ESPINAL**

- Ratas control (Figura 34).

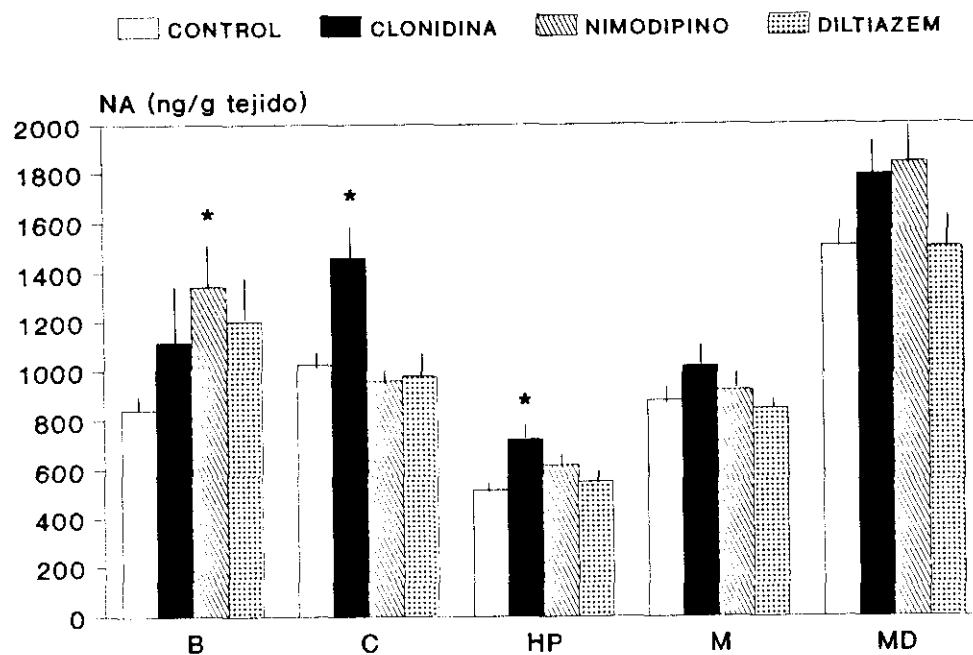
Las ratas control presentaron unos niveles de NA de  $1503 \pm 114.2$  ng/g de tejido,  $n = 8$ . Ninguno de los fármacos empleados modificó dichos niveles de forma significativa.

- Ratas en síndrome de abstinencia (Figura 35).

Las ratas en abstinencia presentaron unos niveles de NA de  $1536 \pm 146.7$  ng/g de tejido,  $n = 8$ .

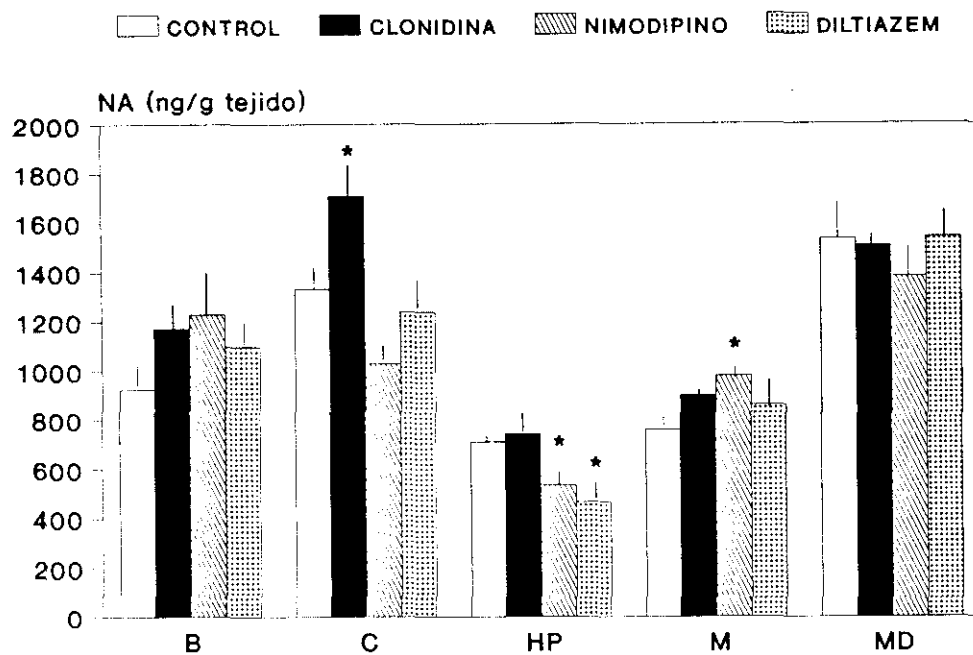
Ninguno de los fármacos empleados modificó de forma significativa los niveles de NA.

## RATAS CONTROL



*Figura 34.* Niveles de noradrenalina (NA) (ng/g de tejido) en bulbo (B), corteza (C), hipocampo (HP), mesencéfalo (M) y médula espinal (MD) de ratas control y tratadas i.p. con clonidina (300  $\mu$ g/kg), nimodipino (10 mg/kg) y diltiazem (20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$

## RATAS EN ABSTINENCIA



*Figura 35.* Niveles de noradrenalina (NA) (ng/g de tejido) en bulbo (B), corteza (C), hipocampo (HP), mesencéfalo (M) y médula espinal (MD) de ratas en síndrome de abstinencia inducido por naloxona i.p. (1 mg/kg) y tratadas i.p. con clonidina (300 µg/kg), nimodipino (10 mg/kg) y diltiazem (20 mg/kg) una hora antes del sacrificio. Las columnas representan valores medios y las barras el E.S.M.,  $n \geq 6$ , \* =  $p < 0.05$



## **5. DISCUSSION**

### 5.1. DE LOS ESTUDIOS EN ILEON.

Es un hecho conocido que las preparaciones FL-PM obtenidas de cobayos tratados crónicamente con morfina desarrollan tolerancia al efecto inhibitor de la morfina sobre las contracciones inducidas por estímulo eléctrico. Nuestros resultados coinciden con otros anteriores (GOLDSTEIN y SCHULZ, 1973; HAMMOND y col., 1976). La dosis de morfina empleada para la inducción de tolerancia fue la de 200 mg/kg por ser la dosis mínima capaz de desarrollar tolerancia sin diferencias significativas con dosis superiores (MARTIN y col., 1989).

Los tres fármacos evaluados (clonidina, nimodipino y diltiazem) son capaces de disminuir la respuesta al estímulo eléctrico en la preparación FL-PM aunque por mecanismos muy diferentes:

- La clonidina reduce la liberación de acetilcolina (ACh) por estímulo de receptores  $\alpha_2$  presinápticos cuando se administra en el baño de órganos (GILLAN y col., 1979).

- El nimodipino y el diltiazem, fármacos de estructura química muy diferente, actúan bloqueando la entrada de calcio a través de canales VOC tipo L (SPEDDING, 1985); de este modo reducen la liberación de ACh a nivel presináptico e *impiden la contracción muscular por déficit de calcio a nivel postsináptico*. Nuestros resultados muestran una inhibición de la respuesta contráctil dosis-dependiente cuando se administran los fármacos en el baño de órganos. Esto coincide con lo descrito anteriormente (WERNER y col., 1972; KAPLITA y TRIGGLE, 1982; MARTIN y col., 1990). Hay que señalar que en las preparaciones procedentes de animales tratados con clonidina, nimodipino o diltiazem, la respuesta al estímulo eléctrico no fue diferente de la observada en preparaciones control, y que tampoco se modificó la inhibición de la

respuesta contráctil inducida por administración de clonidina, nimodipino o diltiazem *in vitro*; esto descarta, en principio, que existan alteraciones en el receptor  $\alpha_2$  o en los canales de calcio tras el tratamiento agudo con los citados fármacos.

### Tolerancia

En la preparación FL-PM ocurre una tolerancia cruzada para diversos agonistas opioides, no encontrándose una especificidad de receptores en su desarrollo, lo que plantea la existencia de múltiples mecanismos de adaptación después de la administración crónica de opioides (SHULZ y col., 1982). Los opioides inhiben el disparo neuronal en el plexo mientérico disminuyendo la liberación de ACh (PATON, 1957). También la clonidina, un agonista  $\alpha_2$ -adrenérgico, es capaz de disminuir la liberación de ACh por su unión a receptores presinápticos que se localizan en las neuronas del plexo mientérico (MALTA y col., 1981). Algunos de los efectos de los agonistas opioides y  $\alpha_2$  adrenérgicos en la preparación FL-PM pueden ser mediados por un efecto directo sobre el metabolismo de los nucleótidos cíclicos intracelulares. Estos parecen estar implicados en la regulación de los movimientos de calcio en los terminales nerviosos efectores interviniendo en el proceso de exocitosis y por tanto en la liberación del neurotransmisor.

Durante la tolerancia a la morfina se ha descrito un aumento de los puntos de unión, en algunas áreas de SNC, para los antagonistas de calcio de la familia de las dihidropiridinas, localizándose preferentemente en hipocampo, hipotálamo, corteza y bulbo (RAMKUMAR y EL-FAKAHANY, 1984, 1988).

Para los receptores  $\alpha_2$  no se han encontrado resultados concluyentes. Las alteraciones descritas para estos receptores son contradictorias, ya que unos autores

observan un aumento en la densidad de receptores (HAMBURG y TALLMAN, 1981), otros un descenso (SMITH y col., 1983) y otros no observan variaciones significativas (VICENTINI y col., 1983).

En nuestros resultados, el tratamiento de los cobayos tolerantes con clonidina incrementa la sensibilidad de las preparaciones al efecto inhibitor de la morfina a la dosis de 0.3 mg/kg, pero la disminuye para dosis inferiores, no siendo el efecto dosis-dependiente. Nuestros resultados en este terreno son contradictorios ya que las variaciones no son constantes durante la tolerancia.

En cuanto a los antagonistas de calcio estudiados, tampoco los resultados son claros; el tratamiento con nimodipino produjo una disminución en la sensibilidad de las preparaciones al efecto inhibitor de la morfina sobre la contracción de la preparación, pero el diltiazem produjo aumento de la sensibilidad para la dosis de 10 mg/kg y disminución para la de 20 mg/kg. Por tanto, aunque la administración aguda de estos fármacos altera las manifestaciones de la tolerancia, no está claro por qué mecanismo y desde luego no parece directamente ligado a su efecto sobre los canales de calcio.

Suponiendo que la tolerancia se desarrolle como una adaptación celular a una exposición prolongada a los opioides, y que la entrada de calcio que ocurre no se considere como una alteración patológica para el organismo, los antagonistas de calcio, que sólo actúan en aquellas condiciones patológicas donde se produce una entrada incontrolada de calcio (BRANDT y col., 1988), no serían capaces de intervenir en el proceso de tolerancia.

Por otra parte, el hecho de que no se encuentren alteraciones en el número de sitios de unión para los opioides durante la tolerancia hace pensar que ésta ocurre por un desacoplamiento entre el receptor opioide y sus sistemas efectores intracelulares (RUBINI y col., 1982).

## Abstinencia

En las preparaciones FL-PM procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina, la naloxona produce un signo de abstinencia que consiste en una fuerte contracción. Esta contracción está provocada por una liberación de ACh (FREDERICKSON y col., 1976; SCHULZ y col., 1985) y de sustancia P (TSOU y col., 1982; CHAHL, 1983) que ocurre por un desplazamiento brusco de los opiáceos de sus receptores (COLLIER y col., 1981; JOHANSON y col., 1987).

El mecanismo exacto por el que se provoca esta liberación no es bien conocido, pero se considera clásicamente como un signo de abstinencia (VAN NUETEN y LAL, 1974).

A nivel periférico la clonidina reduce la actividad neuronal, reduciendo la liberación de ACh en el íleon de cobayo (MALTA y col., 1981; ILHAN y LONG, 1985) e inhibiendo por este mecanismo la respuesta contráctil inducida por naloxona en preparaciones procedentes de cobayos tolerantes a morfina (COLLIER et al., 1981).

Por lo que respecta a los movimientos de calcio, después del tratamiento crónico con morfina aumentan los niveles de calcio cerebrales y la unión de  $\text{Ca}^{45}$  a vesículas sinápticas. Durante el síndrome de abstinencia esos valores retornan a los encontrados en condiciones fisiológicas (YAMAMOTO y col., 1978). Estos cambios en la disposición de calcio son posiblemente la clave de los fenómenos de tolerancia y dependencia (WAY, 1981). De hecho cualquier molécula capaz de alterar la distribución de calcio es capaz de influir en la presentación de signos de abstinencia (BHARGAVA, 1978a).

La implicación del calcio en estos fenómenos hizo que se iniciaran estudios con

los fármacos antagonistas de calcio. Así, se estudiaron previamente los efectos de algunos antagonistas de calcio sobre la dependencia a opiáceos. Estos se mostraron eficaces en la prevención de algunos de los signos de abstinencia en animales *in vivo* (BONGIANNI y col., 1986; BAEYENS y col., 1987). También se han encontrado otras relaciones con el sistema opioide, así, el diltiazem, verapamilo, nifedipino, cinarizino y flunarizino producen antinocicepción e incrementan la analgesia producida por la morfina (BEN-SRETI y col., 1983; DEL POZO y col., 1987).

Durante la abstinencia a opiáceos no sólo se encuentran alteraciones en los receptores y neurotransmisores en SNC, sino que también son detectables e importantes en tejidos periféricos. Se ha podido comprobar que agonistas de receptores  $\alpha_2$  no liposolubles y que, por lo tanto, no atraviesan la barrera hematoencefálica, como el ST-91 (TAYLOR y col., 1988b), son capaces de reducir algunos signos de abstinencia. Asimismo, son numerosos los estudios realizados sobre la abstinencia a opiáceos en receptores  $\alpha_2$  de plaquetas procedentes de adictos a la heroína (GARCIA-SEVILLA y col., 1984, 1985).

Nuestros resultados demuestran que los tratamientos con clonidina, nimodipino o diltiazem son capaces de prevenir la aparición de signos de abstinencia inducidos por naloxona en la preparación FL-PM, tanto cuando se incuban las preparaciones con los distintos fármacos como cuando los animales son tratados por vía sistémica. Esto tiene gran importancia ya que demuestra que los mecanismos implicados en el síndrome de abstinencia tienen un componente periférico detectable en la preparación FL-PM, dicho componente había sido sugerido anteriormente por FRANZ y col. (1982) y BAEYENS y col. (1987). El tratamiento de los animales *in vivo* sigue manteniendo esa capacidad de prevención de los signos de abstinencia periféricos, lo que tiene una potencial

aplicación terapéutica.

El mecanismo por el que se produce este efecto sobre los signos de abstinencia en la preparación FL-PM no es aún bien conocido y se requieren nuevos estudios en este sentido; posiblemente es diferente para la clonidina y para los antagonistas de calcio.

Durante el síndrome de abstinencia ocurre una depolarización en las neuronas del plexo mientérico que podría ser el mecanismo que acercase el potencial de membrana al potencial de descarga de potenciales de acción (JOHNSON y col., 1987b). El mecanismo que explique esta depolarización no ha sido aún determinado. En muchas neuronas la magnitud de la depolarización disminuye cuando la transmisión sináptica es bloqueada por la reducción del calcio extracelular. En nuestro caso, los antagonistas de calcio podrían ejercer un papel similar, reduciendo la disponibilidad de calcio e impidiendo la depolarización (manifestación electrofisiológica del síndrome de abstinencia opioide).

Es posible también, que la depolarización sea el resultado de la alteración del funcionamiento de una bomba iónica dependiente de energía.

*El posible mecanismo por el que los antagonistas de calcio son capaces de evitar la aparición de signos de abstinencia tampoco está totalmente esclarecido. No parece probable una acción directa sobre receptores opioides ya que los antagonistas de calcio no desplazan a la naloxona de sus puntos de unión (BONGIANNI y col., 1986).*

El hecho de que los antagonistas de calcio sean efectivos en la prevención de

signos de abstinencia sin alterar la respuesta de la preparación cuando ésta procede de animales no tolerantes está de acuerdo con lo observado por MIDDLEMISS y SPEDDING (1985) que demostraron que cuando las neuronas liberan altas cantidades de neurotransmisores por una entrada excesiva de calcio, los antagonistas de calcio son activos. Esto podría explicar tanto su efecto en SNC durante la abstinencia, como las acciones observadas en íleon aislado procedente de animales tolerantes tratados con nimodipino o diltiazem.

La clonidina actuaría en el plexo mientérico estimulando receptores  $\alpha_2$ -presinápticos capaces de reducir la liberación de ACh o de sustancia P de modo parecido a como lo hace en SNC, regulando la liberación de noradrenalina (LANGER, 1981). Durante el síndrome de abstinencia se ha descrito un importante aumento en el número de receptores  $\alpha_2$  de alta afinidad directamente relacionado con la gravedad del síndrome de abstinencia, tanto en SNC (SWANN y col., 1983) como en tejidos periféricos (GARCIA-SEVILLA y col., 1984). El tratamiento con clonidina produce un bloqueo funcional de los receptores  $\alpha_2$  que se relacionaría en SNC con una inhibición de la liberación masiva de noradrenalina y consecuentemente una reducción de los síntomas de abstinencia y en el íleon sería capaz de prevenir la liberación brusca de ACh o de sustancia P, lo que se traduce en una disminución de la presentación del signo de abstinencia que evaluamos.

Nuestros resultados aportan una nueva prueba de la efectividad de los antagonistas de calcio en el tratamiento del síndrome de abstinencia. Hemos comparado su eficacia con la de la clonidina, fármaco utilizado ampliamente en el tratamiento de la desintoxicación opiácea en humanos y los resultados han sido similares, siendo incluso más eficaces los antagonistas de calcio. Por otra parte, el



modelo experimental utilizado es de fácil valoración y ha demostrado ser adecuado a la hora de evaluar la capacidad de diversos fármacos para suprimir la sintomatología observada durante el síndrome de abstinencia a morfina.

Cuando las preparaciones se incubaron en líquido nutritivo que contenía morfina, la contracción inducida por naloxona fue más aparente que cuando la incubación se hizo en un medio libre de morfina. Pero el hecho de obtener resultados con las preparaciones procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina e incubadas en solución Krebs libre de morfina, indica que aunque los receptores opioides no estén en contacto con la morfina, la dependencia se mantiene, al menos, durante 45 minutos, tiempo transcurrido durante la realización de las experiencias. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por JOHNSON y col. (1987a) que encuentran contracciones fásicas muy marcadas en la fibra muscular longitudinal después del lavado repetido de la preparación incluso varias horas después.

## 5.2. DE LOS ESTUDIOS DE COMPORTAMIENTO

El tratamiento del grupo control de ratas con clonidina, nimodipino o diltiazem por vía i.p. no produjo alteraciones de la conducta ni de los signos típicos del síndrome de abstinencia en estos animales. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por otros autores en ratones (GREBB, 1986; KAVALIERS, 1987; CONTRERAS y col., 1988) aunque al utilizar dosis unas cinco veces superiores a las usadas por nosotros describen una disminución de la motilidad e incluso muerte del animal para algunas dihidropiridinas antagonistas del calcio (nimodipino, nisoldipino) (GREBB, 1986).

Los signos del síndrome de abstinencia son suprimidos por la clonidina y otros agonistas de receptores  $\alpha_2$  (lofexidina, guanfacina) en animales (TSENG y col., 1975; MEYER y SPARBER, 1976; COLELLI y col., 1976; VETULANI y BEDNARCZYK, 1977; FIELDING y col., 1978; CRAWLEY y col., 1979; LAVERTY y ROTH, 1980; ROTH y col., 1982). La clonidina tiene como efecto principal la disminución de la liberación de *noradrenalina en las neuronas del locus coeruleus* (TAYLOR y col., 1988b) y es usada en el tratamiento del síndrome de abstinencia en el hombre (GOLD y col., 1978; WASHTON y RESNICK, 1980). Aún así, tiene el inconveniente de presentar importantes efectos secundarios como hipotensión y sedación.

También el **sistema dopaminérgico** se ha relacionado con el síndrome de abstinencia ya que antagonistas de la dopamina como el haloperidol previenen el síndrome de abstinencia y disminuyen algunos de los signos del mismo (castañeteo de dientes, retorcimiento (*writhing*), pérdida de peso y sacudidas) (HYNES y col., 1978; LAL y HYNES, 1978).

Tanto la clonidina como el nimodipino y el diltiazem, a las dosis estudiadas, redujeron de forma significativa la presentación de aseo, castañeteo de dientes, diarrea y sacudidas. Sin embargo no modificaron la presentación de cromodacriorrea. Unicamente la clonidina redujo la aparición de ptosis palpebral y evitó la pérdida de peso.

En otros trabajos se ha descrito que el verapamilo, de potencia análoga a los fármacos empleados por nosotros, fue capaz de reducir la ptosis palpebral a dosis mayores que las empleadas por nosotros (BAEYENS y col., 1987).

Los fármacos empleados en la presente Tesis Doctoral han reducido los signos

de abstinencia estudiados en la rata, siendo el orden de potencia para la mayoría de los signos: clonidina > nimodipino > diltiazem.

El salto o *jumping* de los animales no sólo no fue disminuido sino que resultó ligeramente incrementado, aunque sin ser significativo, por el tratamiento con clonidina y diltiazem. Esto podría ser debido a que las dosis no fueron lo suficientemente altas para prevenirlo, dado que BAEYENS y col. (1987) describieron que una dosis i.p. de 30 mg/kg de verapamil (que equivale a una concentración cerebral de 1.5 µg/g) no fue capaz de prevenir los saltos pero sí lo fueron concentraciones mayores en cerebro (160 µg/g), sugiriendo que dicho signo estaba mediado por mecanismos centrales más que periféricos. Aunque dichas dosis son tan altas que posiblemente ejerzan otras influencias y produzcan alteraciones no relacionadas propiamente con el mecanismo de acción de los antagonistas de calcio.

El hecho de que el nimodipino presente tendencia a disminuir la aparición de saltos, aunque sin diferencias significativas, pudiera deberse a su facilidad para atravesar rápidamente la barrera hematoencefálica (SCHOEMAKER y col., 1983) y alcanzar concentraciones eficaces en cerebro antes de que se desencadenen los mecanismos capaces de generar la producción de saltos. Dado que parece que este signo tiene un componente central y que sólo actuando a este nivel se puede evitar (BAEYENS y col., 1987).

Como se ha podido demostrar, el nimodipino y el diltiazem son capaces de prevenir la mayoría de los signos que se presentan durante el síndrome de abstinencia en la rata.

Se sabe también que durante el síndrome de abstinencia al etanol se modifica

la sensibilidad del  $\text{Ca}^{++}$  cerebral (DOLIN y col., 1987). El hecho de el nimodipino haya resultado eficaz para el tratamiento de pacientes con síndrome de abstinencia moderado al alcohol (ALTAMURA y col., 1990), hace pesar que las DHP están implicadas en aquellas situaciones de excesiva liberación de neurotransmisores que se encuentran en los diferentes tipos de síndromes de abstinencia, y que por lo tanto presentan un potencial terapéutico de cara a su utilización en pacientes con estas manifestaciones.

### 5.3. DE LOS NIVELES DE MONOAMINAS.

#### Sistema serotoninérgico.

##### ● RATAS CONTROL

A pesar de que según todas las evidencias, los antagonistas de calcio no producen importantes efectos sobre el bloqueo de canales de calcio en situación fisiológica (MIDDLEMISS y SPEDDING, 1985; BRANDT y col., 1988), nuestros resultados revelan que en los animales del grupo control, los antagonistas de calcio estudiados aumentan la actividad del sistema serotoninérgico en todas las estructuras estudiadas, siendo el aumento significativo en mesencéfalo (nimodipino y diltiazem) y en corteza (diltiazem), regiones que son ricas en receptores opioides (GOODMAN y SNYDER, 1982; ITZHAK y col., 1982a,b). Este aumento ocurre fundamentalmente por la elevación de los niveles de 5-HIAA y en el caso de la corteza, por una disminución de los niveles

## 5-HT.

Otros autores han encontrado también que las dihidropiridinas ejercen complejos cambios en la función serotoninérgica. Recientemente GREEN y col. (1990) han encontrado que el tratamiento de las ratas con felodipino quince minutos antes de usar tranilcipromina (inhibidor de la degradación de 5-HT), da como resultado un aumento de la actividad locomotora y del "pseudosíndrome de abstinencia" producido por 5-HT. El pretratamiento con BAY K 8644 no modifica el efecto producido por el felodipino, pero la administración conjunta de BAY K 8644 y felodipino produce una respuesta mayor. Estos resultados sugieren que la interacción de las DHP con el sistema serotoninérgico no se ejerce a través de su acción como agonistas o antagonistas de los canales de calcio.

En este sentido PILEBLAD y CARLSSON (1987) han encontrado que ocurre una disminución en la acumulación de 5-hidroxitriptofano después de la administración de nimodipino y BAY K 8644 en ratón. Por su parte, BROWN y col. (1986) encontraron que el diltiazem producía una inhibición de la entrada de 5-HT en sinaptosomas.

Todas estas observaciones sugieren que los efectos de los antagonistas de calcio sobre la función serotoninérgica, no ocurren solamente a través de canales voltaje-dependientes tipo L --su mecanismo principal-- sino que podrían estar mediados por acciones indirectas o ejercidas a través de otros tipos de receptores. En este contexto, es interesante destacar que el nifedipino (antagonista de  $\text{Ca}^{2+}$ ) y el BAY K 8644 (activador) potencian los efectos inhibitorios de la adenosina y desplazan a los analógicos de la adenosina de sus receptores, pero no presentan este efecto sobre otros tipos de receptores, lo que apunta la posibilidad de una relación funcional entre los receptores de adenosina y los sitios de unión de DHP. Pero otros antagonistas como

el nimodipino, el nitrendipino o el verapamíl no son capaces de producir el mismo efecto (SWANSON y GREEN, 1986; BARTRUP y STONE, 1990).

Otra posible relación de los antagonistas de calcio es la que ocurre con los fosfatidilinositoles, inhibiendo su recambio (KENDALL y NAHORSKI, 1985) o interactuando con la ATPasa de calcio (DAVID-DUFHILO y col., 1984).

La clonidina produce el efecto contrario al de los antagonistas de calcio, encontrándose en nuestros resultados una disminución del recambio de 5-HT que es significativa en el mesencéfalo.

Lo cual se podría explicar por una disminución de la liberación del neurotransmisor de acuerdo con los resultados de XIANG y col. (1990), que encuentran una disminución en la entrada de  $^{45}\text{Ca}$  al sinaptosoma principalmente a través de canales de calcio tipo N.

#### ● RATAS EN ABSTINENCIA.

El tratamiento crónico con morfina es capaz de alterar la concentración y velocidad de recambio de 5-HT en SNC (WAY y col., 1968; HO y col., 1972; HAUBRICH y BLAKE, 1973; ROMANDINI y col., 1984), y es probable que los antagonistas de calcio puedan modificar el recambio de 5-HT durante el síndrome de abstinencia.

COLADO y col. (1989) encontraron que el nifedipino impedía los cambios que se producían en el recambio de 5-HT durante el síndrome de abstinencia en cobayo.

Nosotros hemos encontrado que durante el síndrome de abstinencia por administración de naloxona en la rata, ocurre un incremento de los niveles de 5-HIAA en bulbo e hipocampo. También se produce un aumento significativo de la velocidad

de recambio de 5-HT en bulbo, corteza, hipocampo y médula espinal, resultados que están de acuerdo con los obtenidos por HO y col., 1972; HAUBRICH y BLAKE, 1973; ROMANDINI y col., 1984.

El tratamiento con nimodipino y diltiazem no modificó el recambio de 5-HT en ninguna de las áreas estudiadas. Sin embargo la clonidina disminuyó de forma significativa el recambio de 5-HT en bulbo, corteza, hipocampo y mesencéfalo. La disminución se produjo fundamentalmente por una disminución en los niveles de 5-HIAA.

De acuerdo con los resultados obtenidos, parece que los antagonistas de calcio no influyen, en el mismo sentido que la clonidina, en la modificación de los niveles de indolalquilaminas en el síndrome de abstinencia. Tampoco modifican los niveles de 5-HT y 5-HIAA. Pero como a pesar de ésto son capaces de impedir los signos que se desencadenan durante el síndrome de abstinencia, por tanto no parece que el sistema serotoninérgico esté relacionado con la producción de estos signos.

#### Noradrenalina.

##### ● RATAS CONTROL.

En situación control la clonidina aumenta los niveles de NA en todas las estructuras estudiadas, siendo el aumento significativo en corteza e hipocampo.

El nimodipino sólo tiene efecto en el bulbo, donde incrementa los niveles de NA. En el resto de las estructuras prácticamente no modifica dichos niveles, excepto en la médula espinal, donde se ha encontrado un ligero aumento que no ha sido significativo.

El diltiazem, aunque no ha presentado ningún efecto significativo, ha mostrado una tendencia a aumentar los niveles de NA en el bulbo de forma análoga al nimodipino.

Como ya se ha citado anteriormente, el hecho de que los antagonistas de calcio no muestren actividad en condiciones fisiológicas (MIDDLEMISS y SPEDDING, 1985; BRANDT y col., 1988) está de acuerdo con resultados obtenidos por nosotros en situación control. El aumento de NA que se ha detectado en el bulbo, tras el tratamiento con nimodipino, posiblemente se deba a que el nimodipino puede, a ese nivel, impedir la liberación de neurotransmisor que sigue almacenado y es detectado al homogeneizar el tejido.

Las alteraciones de los puntos de unión de los antagonistas de calcio han sido estudiadas durante el desarrollo de la tolerancia (RAMKUMAR y EL-FAKAHANY, 1984, 1988). La morfina actúa principalmente a través de receptores  $\mu$  e inhibe la unión de nimodipino- $[H^3]$  en corteza y cerebelo, pero algo menos en hipocampo y estriado; y no produce modificaciones en hipotálamo y bulbo (GANDHI y ROSS, 1988). Estos resultados podrían explicar por qué sí se observan efectos en el bulbo en nuestros resultados, pero no hemos encontrado referencias que hayan estudiado el número de sitios de unión durante la abstinencia.

El nimodipino es capaz de reducir el contenido de MHPG (principal metabolito de la NA) que se presenta en algunas áreas del cerebro (corteza, hipocampo) durante el síndrome de abstinencia en rata (BONGIANNI y col., 1986).

GANDHI y ROSS (1988) han postulado que posiblemente los receptores opioides puedan estar acoplados directamente a los canales de calcio tipo L, ya que han encontrado que el agonista  $\kappa$  U-50488H inhibe la unión de nimodipino- $[H^3]$  de



forma concentración- dependiente, siendo revertido el efecto por el antagonista de esos receptores, MR-2266. Esto podría indicar que los agonistas opioides del receptor  $\kappa$  en tratamiento crónico no impiden la entrada de calcio en la célula y por tanto no resultaría afectada la liberación de neurotransmisores.

Nosotros no hemos encontrado modificaciones en los niveles de NA por el tratamiento crónico con morfina ni tampoco en las ratas en síndrome de abstinencia, lo que está en contra de los resultados obtenidos por otros autores (SWANN y col., 1983; AGHAJANIAN, 1978), que encontraron un aumento en la liberación de NA en el *locus coeruleus*.

Durante el síndrome de abstinencia hemos encontrado que la clonidina aumenta los niveles de NA en todas las estructuras excepto en la médula espinal, siendo el aumento significativo en la corteza. Este aumento de NA está en contra del efecto descrito para la clonidina en el *locus coeruleus* donde se sabe que bloquea la hiperactivación noradrenérgica que ocurre durante el síndrome de abstinencia (SVENSSON y col., 1975; AGHAJANIAN, 1978). Una posible explicación a este hecho es que los niveles medidos por nosotros correspondan a la NA almacenada en las vesículas, la cual sería detectable durante la homogeneización del tejido.

Por otra parte, estudios más recientes han encontrado que el tratamiento crónico con morfina disminuye la unión específica de clonidina en membranas neuronales (SMITH y col., 1989), lo que puede ser otra explicación para el aumento encontrado por nosotros en los niveles de NA.

El nimodipino aumenta los niveles de NA en bulbo y mesencéfalo en las ratas en abstinencia, siendo el aumento significativo para esta última estructura y los disminuye, aunque no significativamente, en corteza, hipocampo y médula espinal.

PELLEGRINI-GIAMPIETRO y col. (1988) han encontrado que la naloxona es capaz de liberar NA por estimulación con  $K^+$  en cortes de cerebro procedentes de ratas morfinodependientes y que el efecto es antagonizado por nimodipino. Pero las mismas dosis de nimodipino no ejercen ningún efecto en cortes procedentes de ratas control. En este modelo, el nimodipino suprime los efectos producidos por la naloxona, al igual que ocurre con las observaciones hechas *in vivo*. Aún así, existen estudios que complican más la situación. Es el caso de REIMANN y KOELLHOFER (1988), que han encontrado que el nimodipino es capaz de facilitar, aunque discretamente, la liberación de noradrenalina- $[^3H]$  en cortes de corteza.

Según nuestros resultados el diltiazem presenta tendencia a aumentar los niveles de NA en bulbo y mesencéfalo y tendencia a disminuirlos en corteza e hipocampo, de forma significativa en esta última estructura.

Estos resultados tan dispares podrían explicarse, como ya hemos indicado anteriormente, por una acción indirecta o en receptores diferentes a los canales de calcio voltaje-dependientes tipo L. Algunas dihidropiridinas son capaces de potenciar la acción inhibitoria de la adenosina (BARTRUP y STONE, 1990), pudiendo por ello estar aumentada la neurotransmisión por un mecanismo de inhibición de vías inhibitorias. La extensa distribución de los receptores opioides en el cerebro, no sólo en áreas fundamentalmente noradrenérgicas apoya la idea de que no sólo el sistema noradrenérgico influye en el síndrome de abstinencia (REDMOND y KRISTAL, 1984).

## **6. RESUMEN**

- La preparación fibra-longitudinal-plexo mientérico de íleon de cobayo procedente de cobayos tratados crónicamente con morfina mediante inyección subcutánea de una suspensión oleosa de morfina es capaz de desarrollar tolerancia al efecto inhibitor de la morfina administrada en el baño de órganos.

- La incubación con dosis acumulativas de clonidina, nimodipino y diltiazem es capaz de reducir la contracción muscular en la preparación fibra-longitudinal plexo mientérico de íleon de cobayos control.

- El desarrollo de tolerancia en las preparaciones procedentes de cobayos tratados crónicamente con morfina produce una disminución de la sensibilidad de las preparaciones al efecto inhibitor de la contracción de la clonidina y el nimodipino, mientras que para el caso del diltiazem la sensibilidad resulta aumentada, lo que indica que no parece que el bloqueo de la entrada de calcio tenga un papel importante en la presentación de latolerancia en la preparación.

- La abstinencia desencadenada por retirada del depósito subcutáneo de morfina a diferentes tiempos y valorada la respuesta de las preparaciones al efecto inhibitor de la morfina, no refleja un patrón uniforme de recuperación de sensibilidad a la morfina.

- La administración en el baño de órganos de diferentes dosis acumulativas de clonidina, nimodipino y diltiazem reduce la respuesta contráctil inducida por naloxona

en la preparación fibra-longitudinal-plexo mientérico de íleon de cobayo, siendo el orden de potencia, nimodipino > clonidina > diltiazem, y resultando un efecto dosis dependiente.

- El tratamiento de los cobayos in vivo por administración i.p. de diferentes dosis de clonidina, nimodipino y diltiazem, redujo la presentación de contracción muscular inducida por naloxona en las preparaciones procedentes de cobayos morfinodependientes, siendo el orden de potencia, clonidina > nimodipino > diltiazem.

- La clonidina (0.3 mg/kg), el nimodipino (10 mg/kg) y el diltiazem (20 mg/kg) administrados i.p. no provocan alteraciones del comportamiento en ratas control. Sin embargo disminuyen muchos de los signos de abstinencia que se desencadenan en ratas morfinodependientes por inyección i.p. de naloxona.

- El nimodipino y el diltiazem ocasionan un aumento de la actividad serotoninérgica en animales control, posiblemente por un mecanismo no relacionado con el bloqueo de los canales de calcio.

- El nimodipino y el diltiazem no modifican el recambio de 5-HT en las ratas en abstinencia mientras que la clonidina lo disminuye.

- La clonidina aumenta los niveles de NA en corteza e hipocampo. Y el nimodipino lo hace en el bulbo en animales controles.

- Durante el síndrome de abstinencia desencadenado por naloxona, la clonidina

aumenta los niveles totales de NA en todas las estructuras cerebrales estudiadas, pero no en la médula. El nimodipino aumenta los niveles en bulbo y mesencéfalo y el diltiazem los disminuye en hipocampo.

## **7. CONCLUSIONES**

1-. No hemos encontrado una explicación satisfactoria que describa el papel de la clonidina, el nimodipino y el diltiazem sobre los fenómenos de tolerancia, ya que los resultados obtenidos han sido contradictorios, produciéndose cambios en dos sentidos, bien aumentando la tolerancia o bien disminuyéndola.

2-. Tanto los antagonistas de calcio, nimodipino y diltiazem, como la clonidina resultan eficaces en la prevención de los signos de abstinencia debido en parte a un mecanismo periférico. Este efecto se manifiesta tanto cuando se administran los fármacos directamente en la preparación FL-PM, como cuando se administran por vía sistémica, interviniendo en este caso posiblemente un componente de origen central.

3-. No hemos encontrado una correlación entre las variaciones de los niveles de monoaminas (5-HT, NA) durante los procesos que determinan la tolerancia ni la abstinencia. Tampoco las variaciones observadas después de los tratamientos con los antagonistas de calcio y la clonidina parecen relacionadas con el efecto de estos fármacos en la prevención del síndrome de abstinencia.

4-. Por todo lo anterior pensamos que los antagonistas de calcio estudiados presentan una potencial aplicación terapéutica importante de cara al tratamiento del síndrome de abstinencia opioide. ■



## **8. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS**

- ABEL, P.W.; URQUILLA, P.R.; GOTO, K.; WESTFALL, D.P.; ROBINSON, R.L. y FLEMING, W.W. (1981). Chronic reserpine treatment alter sensitivity and membrane potential of the rabbit saphenous artery. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217: 430-439.
- ABOOD, M.E.; LAW, P. y LOH, H.H. (1985). Pertussis toxin treatment modifies opiate action in the rat brain striatum. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127: 477-483.
- AGHAJANIAN, G.K. (1978). Tolerance of *locus coeruleus* neurones to morphine and supression of withdrawal responses by clonidine. *Nature* 276: 186-188.
- AHR, G.; WINGENDER, W. y KUHLMAN, J. (1987). Pharmacokinetics of nisoldipine. En: HUGENHOLTZ, P.G. y MEYER, J. (eds.) *Nisoldipine 1987*, Berlin, Springer-Verlag, pp. 59-66.
- AKIL, H.; HEWLETT, W.A.; BVARCHAS, J.D. y LI, C.H. (1980). Binding of [<sup>3</sup>H]beta-endorphin to rat brain membranes: Characterization of opiate properties and interaction with ACTH. *Eur. J. Pharmacol.* 64: 1-8.
- AKIYAMA, K.; GEE, K.W.; MOSBERG, H.I.; HRUBY, V.J. y YAMAMURA, H.I. (1985). Characterization of [<sup>3</sup>H][2-D-penicillamine,5-D-penicillamine]enkephalin binding to  $\delta$  opiate receptors in the rat brain and neuroblastoma-glioma hybrid cell line (NG 108-15). *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 82: 2543-2547.
- ALDUNATE, J.; YOJAY, L. y MARDONES, J. (1975). Studies on the mechanism of the action of morphine on the peristalsis of guinea pig ileum in situ. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 291: 395-403.
- ALGUACIL, L.F.; ALAMO, C.; SANTOS, C. y CUENCA, E. (1987). Yohimbine reduces morphine tolerance in guinea-pig ileum. *Life Sci.* 40: 155-160.
- ALTAMURA, A.C.; REGAZZETTI, M.G. y PORTA, M. (1990). Nimodipine in human alcohol withdrawal syndrome-an open study. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 1: 37-40.
- AMBACHE, N. (1954). Separation of the longitudinal muscle of the rabbit's ileum as a broad sheet. *J. Physiol.* 125: 53P-55P.
- ANDEN, N.E. y GRABOWSKA, M. (1976). Pharmacological evidence for an stimulation of dopamine neurons by noradrenaline neurons in the brain. *Eur. J. Pharmacol.* 39: 275-282.
- ANDRADE, R.; VANDERMAELEN, C.P. y AGHAJANIAN, G.K. (1983). Morphine tolerance

- and dependence in the *locus coeruleus*: single cell studies in brain slices. *Eur. J. Pharmacol.* 91: 161-169.
- ARTALEJO, C.R. y GARCIA, A.G. (1986). Calcio-antagonistas: Bases farmacológicas para su manejo clínico. *Farmacoterapia* 3: 1-14.
- ATTALI, B.; GOUARDERES, C.; MAZARGUIL, H.; AUDIGIER, Y. y CROS, J. (1982). Evidence for multiple 'kappa' binding sites by use of opioid peptides in the guinea pig lumbo-sacral spinal cord. *Neuropeptides* 3: 53-59.
- ATTALI, B.; SAYA, D. y VOGEL, Z. (1989). K-Opiate agonists inhibit adenylate cyclase and produce heterologous desensitization in rat spinal cord. *J. Neurochem.* 52: 360-369.
- AXELROD, J. (1956). The enzymatic N-demethylation of narcotic drugs. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 117: 322-330.
- BAARNHEILM, C. y HANSSON, G. (1986). Oxidation of 1,4-dihydropyridines by prostaglandin synthetase and the peroxidic function of cytochrome P-450. Demonstration off a free radical intermediate. *Biochem. Pharmacol.* 35: 1419-1422.
- BAEYENS, J.M.; ESPOSITO, E.; OSSOWSKA, G. y SAMANIN, R. (1987). Effects of peripheral and central administration of calcium channel blockers in the naloxone-precipitated abstinence syndrome in morphine-dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 9-13.
- BAKER, P.F. y GLITISCH, H.G. (1975). Voltage-dependent changes in the permeability of nerve membranes to calcium and other divalent cations. *Philos. Trans. R. Soc. London B.* 270: 389-409.
- BARABAN, J.M. y AGHAJANIAN, G.K. (1980). Suppression of firing activity of 5-HT neurons in the dorsal raphe by alpha-adrenoceptor antagonists. *Neuropharmacology* 9: 355-363.
- BARABAN, J.M. y AGHAJANIAN, G.K. (1981). Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: Demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.*: 663-670.
- BARONDES, S.H. (1974). Synaptic macromolecules. *Annu. Rev. Biochem.* 43: 147-168.

- BARTHO, L.; SEBOK, B. y SZOLCSANYI, J. (1982). Indirect evidence for the inhibition of enteric substance P neurones by opiate agonists but not by capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* 77: 273-279.
- BARTRUP, J.T. y STONE, T.W. (1990). Dihydropyridines alter adenosine sensitivity in the rat hippocampal slice. *Br. J. Pharmacol.* 101: 97-102.
- BEAN, B.P.; STUREK, M.; PUGA, A. y HERSMEYER, K. (1987). Bloqueo de canales de  $\text{Ca}^{++}$  por nitrendipino en músculo cardíaco y vascular. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9 (Suppl. 4): 19-27.
- BELLEMAN, P.; FERRY, D.R.; LUBBECKE, F. y GLOSSMANN, H. (1981). [ $^3\text{H}$ ]nitrendipine a potent calcium antagonist, bind with high affinity to cardiac membranes. *Arzneim. Forsch.* 31: 2064-2067.
- BEN-SRETI, M.M.; GONZALEZ, J.P. y SEWELL, R.D.E. (1983). Effects of elevated calcium and calcium antagonists on 6-7-benzomorphan-induced analgesia. *Eur. J. Pharmacol.* 90: 385-391.
- BHARGAVA, H.N. (1978b). The effects of naltrexone on the development of physical dependence on morphine. *European. J. Pharmacol.* 50: 193-202
- BHARGAVA, H.N. (1978a). The effects of divalent ions on morphine analgesia and abstinence syndrome in morphine-tolerant and dependent mice. *Psychopharmacology* 57: 223-225.
- BHARGAWA, H.N. y WAY, E.L. (1972). Acetylcholinesterase inhibition and morphine effects in morphine tolerant and dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 183(1): 31-40.
- BIGGIO, G.; CASU, M.; CORDA, M.G.; DIBELLO, C. y GESSA, G.L. (1978). Stimulation of dopamine synthesis in caudate nucleus by intrastriatal enkephalins and antagonism by naloxone. *Science* 200: 552-554.
- BIRD, S.J. y KUCHAR, M.J. (1977). Ionophoretic application of opiates to the *locus coeruleus*. *Brain Res.* 122: 523-533.
- BOLTON, T.B. (1979). Mechanisms of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Physiol. Rev.* 59: 606-718.
- BONGIANNI, F.; CARLA, V.; MORONI, F. y PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E. (1986).

Calcium channel inhibitors suppress the morphine-withdrawal syndrome in rats. *Br. J. Pharmacol.* 88: 561-567.

BORNSTEIN, J.C.; COSTA, M.; FURNESS, J.B. y LEES, G.M. (1984). Electrophysiological and enkephalin immunoreactivity of identified myenteric plexus neurones of guinea-pig small intestine. *J. Physiol.* 351: 313-325.

BOU, J.; LLENAS, J. y MASSINGHAM, R. (1983). Calcium entry blocking drugs "calcium antagonists" and vascular smooth muscle function. *J. Auton. Pharmacol.* 3: 219.

BOWEN, W.D.; GENTELMAN, S.; HERKENBARN, M. y PERT, C.B. (1981). Interconverting *mu* and *delta* forms of the opiate receptors in rat striatal patches. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 4818-4822.

BRANDT, L.; ANDERSSON, K.E.; LJUNGGREN, B.; SAEVELAND, H. y RYMAN, T. (1988). Cerebrovascular and cerebral effects of nimodipine and update. *Acta Neurochir.* 45 Suppl (Wien): 11-20.

BRANDT, N. (1985). Identification of two populations of cardiac microsomes with nitrendipine receptors: correlation of the distribution of dihydropyridine receptors with organelle specific markers. *Arch. Biochem. Biophys.* 242: 306-319.

BROWN, N.L.; SIRUGUE, O. y WORCEL, M. (1986). The effects of some slow channel blocking drugs on high affinity serotonin uptake by rat brain synaptosomes. *Eur. J. Pharmacol.* 123: 161-165.

BRUM, G. y RIOS, E. (1986). Calcium and the voltage sensor of skeletal muscle excitation-contraction coupling. *Biophys. J.* 49: 459A.

BURNS, D.L.; HEWLETT, E.L.; MOSS, J. y VAUGHAN, M. (1983). Pertussis toxin inhibits enkephalin stimulation of GTPase of NG108-15 cells. *J. Biol. Chem.* 258: 1435-1438.

CARAFOLI, E. (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 395-433.

CARDENAS, H.L. y ROSS, D.H. (1975). Morphine-induced depletion of calcium in discrete regions of rat brain. *J. Neurochem.* 24: 487-493.

CARDENAS, H.L. y ROSS, D.H. (1976). Calcium depletion of synaptosomes after

- morphine treatment. *Br. J. Pharmacol.* 57: 521-526.
- CASEY, P.J. y GILMAN, A.G. (1988). G protein involvement in receptor-effector coupling. *J. Biol. Chem.* 263: 2577-2580.
- CERVO, L.; ROCHAT, C.; ROMANDINI, S. y SAMANIN, R. (1981). Evidence of a preferential role of brain serotonin in the mechanism leading to naloxone-precipitated compulsive jumping in morphine-dependent rats. *Psychopharmacology* 74: 271-274.
- CHAHAL, L.A. (1983). Contracture of guinea-pig ileum on withdrawal of methionine<sup>5</sup>-enkephalin is mediated by substance P. *Br. J. Pharmacol.* 80: 741-749.
- CHAHAL, L.A. (1988). Capsaicin pretreatment does not inhibit the opioid withdrawal response in guinea-pigs. *Eur. J. Pharmacol.* 158: 91-98.
- CHAHAL, L.A. y THORNTON, C.A. (1987). Locomotor activity and contracture of isolated ileum precipitated by naloxone following treatment of guinea-pig with a single dose of morphine. *J. Pharm. Pharmacol.* 39: 52-54.
- CHALAZONITIS, A. y CRAIN, S.M. (1986). Maturation of opioid sensitivity of fetal mouse dorsal root ganglion neuron perikarya in organotypic cultures: regulation by spinal cord. *Neuroscience* 17: 1181-1198.
- CHANGEUX, J.P. (1981). The acetylcholine receptor: an "allosteric" membrane protein. *Harvey Lect.* 75: 85-254.
- CHAPMAN, D.B. y WAY, E.L. (1980). Metal ion interactions with opiates. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 20: 553-579.
- CHAVKIN, C. y GOLDSTEIN, A. (1984). Opioid receptor reserve in normal and morphine tolerant guinea pig ileum myenteric plexus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 7253-7257.
- CHENEY, D.L. y GOLDSTEIN, A. (1971a). The effect of p-chlorophenylalanine on opiate-induced running, analgesia, tolerance and physical dependence in mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 177:309-315.
- CHENEY, D.L.; GOLDSTEIN, A.; ALGERI, S. y COSTA, E. (1971). Narcotic tolerance and dependence: Lack of relationship with serotonin turnover in the brain. *Science* 171: 1169-1171.

- CHERUBINI, E. y NORTH, R.A. (1985). *Mu* and *kappa* opioids inhibit transmitter release by different mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 1860-1863.
- CHIBATA, I. (1988) *Diltiazem: Desde su descubrimiento hasta hoy*, Barcelona, Prous, pp. 82-88.
- CHILDERS, S.R. (1988). Opiate-inhibited adenylate cyclase in rat brain membranes depleted of Gs-stimulated adenylate cyclase. *J. Neurochem.* 50: 543-553.
- CHILDERS, S.R.; MANTOV, S. y SNYDER, S.H. (1977). Enkephalin: Radioimmuno-assay and radioreceptor assay in morphine dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 46: 289-293.
- CHIU, T.H. (1978). Chronic effects of 6-hydroxydopamine and reserpine on myocardial adenylate cyclase. *Eur. J. Pharmacol.* 52: 385-388.
- CHRISTIE, M.J.; WILLIAMS, J.T. y NORTH, R.A. (1987). Cellular mechanisms of opioid tolerance: studies in single brain neurons. *Mol. Pharmacol.* 32: 633-638.
- CLAY, G.A. y BROUGHAM, L.R. (1975). Haloperidol binding to an opiate receptor site. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1363-1367.
- CLOUET, D.H. (1975). Possible roles of catecholamines in the action of narcotic drugs. En: FRIEDHOFF, A.J. (eds.) *Catecholamines and Behavior*, New York, Plenum, pp. 103-107.
- CLOUET, D.H. y RATNER, M. (1970). Catecholamine biosynthesis in brains of rats treated with morphine. *Science* 168: 854-856.
- CLOUET, D.H. y WILLIAMS, N. (1973). Localization in brain particulate fractions of narcotic analgesic drugs administered intracisternally to rats. *Biochem. Pharmacol.* 22: 1283-1293.
- COCHIN, J. y AXELROD, J. (1959). Biochemical and pharmacological changes in the rat following chronic administration of morphine, nalorphine and normorphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 125: 105-110.
- COLADO, M.I.; LORENZO, P. y MARTIN, M.I. (1989). Nifedipine reversal of decreased serotonin metabolite levels during morphine withdrawal. *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* 298: 61-67.

- COLELLI, B.; MEYER, D.R. y SPARBER, S.B. (1976). Clonidine antagonizes disruption of fixed ratio operant behavior in morphine pelleted rats given naloxone, *Pararmacologist* 18(672): 236.
- COLLIER, H.O.J. (1966). Tolerance, physical dependence and receptors (a theory of the genesis of tolerance and physical dependence through drug induced changes in the number of receptors). *Adv. Drug Res.* 3: 171-188.
- COLLIER, H.O.J. (1974). The concept of the quasi-abstinence effect and its use in the investigation of dependence mechanisms. *Pharmacology* 11: 58-61.
- COLLIER, H.O.J. (1980). Cellular site of opioid dependence. *Nature* 283: 625-629.
- COLLIER, H.O.J.; CUTHBERT, N.J. y FRANCIS, D.L. (1981). Clonidine dependence in the guinea-pig isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.* 73: 443-453.
- COLLIER, H.O.J. y FRANCIS, D.L. (1975). Morphine abstinence is associated with increased brain cyclic AMP. *Nature* 255: 159-162.
- COLLIER, H.O.J.; FRANCIS, D.L.; HENDERSON, G. y SCHNEIDER, C. (1974). Quasi-morphine-abstinence syndrome. *Nature* 249: 471-473.
- COLLIER, H.O.J.; PLANT, N.T. y TUCKER, J.F. (1983). Pertussis vaccine inhibits the chronic but not acute action of normorphine on the myenteric plexus of guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 91: 325-326.
- COLLIER, H.O.J. y ROY, A.C. (1974). Morphine-like drugs inhibit the stimulation by E prostaglandins of cyclic AMP formation by rat brain homogenate. *Nature* 248: 24-27.
- COLQUHOUN, D.; RANG, H.P. y RITCHE, J.M. (1974). The binding of tetrodotoxin and  $\alpha$ -bungarotoxin to normal and denervated mammalian muscle. *J. Physiol.* 240: 199-226.
- CONTRERAS, E.; TAMAYO, L. y AMIGO, M. (1988). Calcium channel antagonists increase morphine induced analgesia and antagonize morphine tolerance. *Eur. J. Pharmacol.* 148: 463-466.
- CORRIGALL, W.A.; LINSEMAN, M.A.; LUCATO, R.M. y ELLIOT, M. (1981). Differential tolerance to the effects of morphine on evoked activity in the hippocampal slice. *Life Sci.* 28: 1613-1620.



- COSTA, T.; AKTIRIES, K.; SCHULTZ, G. y WÜSTER, M. (1983). Pertussis toxin decreases opiate receptor binding and adenylate cyclase inhibition in a neuroblastoma x glioma cell line. *Life Sci.* 33: 219-222.
- COUPAR, I.M. (1987). Opioid action on the intestine: the importance of the intestinal mucosa. *Life Sci.* 41: 917-925.
- COX, B.M. (1978). Multiple mechanisms in opiate tolerance. En: VAN REE, J. y TERENIUS, L. (eds.) *Characteristics and Functions of Opioids*, Elsevier North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 13-23.
- COX, B.M. (1979). Characteristics of the increased response to electrical stimulation of ileum preparations from morphine pretreated guinea pigs. *Life Sci.* 24: 1503-1510.
- COX, B.M.; OPHEIM, K.; TESCHEMACHER, H. y GOLDSTEIN, A. (1975). A peptide-like substance from pituitary that acts like morphine. 2. Purification and properties. *Life Sci.* 16: 1777-1782.
- COX, B.M. y OSMAN, O. (1970). Inhibition of the development of tolerance to morphine in rats by drugs inhibit ribonucleic acid or protein synthesis. *Br. J. Pharmacol.* 38: 157-170.
- COX, B.M. y PADHYA, R. (1977). Opiate binding and effect in ileum preparations from normal and morphine pretreated guinea-pigs. *Br. J. Pharmacol.* 61: 271-278.
- CRAIN, S.M. (1988). Regulation of excitatory opioid responsivity of dorsal root ganglion neurons. En: ILLES, P. y FARSANG, C. (eds.) *Regulatory of Opioid Peptides*, Germany, VCH Pblubishers, pp. 186-201.
- CRAIN, S.M.; CRAIN, B.; FINNIGAN, T. y SIMON, E.J. (1979). Development of tolerance to opiates and opioid peptides in organotypic cultures of mouse spinal cord. *Life sci.* 25: 1797-1802.
- CRAIN, S.M.; CRAIN, B. y MAKMAN, M.H. (1987). Pertussis toxin blocks depressant effectts of opioid, monoaminergic and muscarinic agonists of dorsal-horn network responses in spinal cord-ganglion cultures. *Brain Res.* 400: 185-190.
- CRAIN, S.M.; CRAIN, B.; PETERSON, E.R. (1982). Development of cross-tolerance to 5-hydroxytryptamine in organotypic cultures of mouse spinal cord-ganglia during cronic exposure to morphine. *Life sci.* 31:

241-247.

- CRAIN, S.M.; CRAIN, B.; PETERSON, E.R. y SIMON, E.J. (1978). Selective depression by opioid peptides of sensory-evoked dorsal-horn network responses in organized spinal cord cultures. *Brain Res.* 157: 196-201.
- CRAIN, S.M.; PETERSON, E.R.; CRAIN, B. y SIMON, E.J. (1977). Selective opiate depression of sensory-evoked synaptic networks in dorsal horn regions of spinal cord cultures. *Brain Res.* 133: 162-166.
- CRAWLEY, J.N.; LAVERTY, R. y ROTH, R.H. (1979). Clonidine reversal of increased norepinephrine metabolite levels during morphine withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 57: 247-250.
- CREESE, I.; FEINBERG, A.P. y SNYDER, S.H. (1976). Butyrophenone influences on the opiate receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 36: 231-235.
- CURTIS, B.M. y CATERALL, W.A. (1984). Purification of calcium antagonists receptor of the voltage-sensitive calcium channel from skeletal muscle transverse tubules. *Biochemistry* 23: 2123-2128.
- DAVID, M.; MOISAND, C.; MEUNIER, J.-C.; MORGAT, J.-L.; CACEL, G. y ROQUES, B.P. (1982). [<sup>3</sup>H]Tyr-D-Ser-Gly-Phe-Leu-Thr: a specific probe for the  $\delta$ -opiate receptor subtype in brain membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 78: 385-387.
- DAVID-DUFILHO, M.; DEVYNCK, M.A.; KAZDA, S. y MEYER, P. (1984). Stimulation by nifedipine of calcium transport by cardiac sarcolemmal vesicles from spontaneously hypertensive rats. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 121-127.
- DAVIS, M.E.; AKERA, T. y BRODY, T.M. (1975). Saturable binding of morphine to rat brain-stem slices and the effect of chronic morphine treatment. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 12: 409-418.
- DAVIS, M.E.; AKERA, T. y BRODY, T.M. (1979). Reduction of opiate binding to brain stem slices associated with the development of tolerance to morphine in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 211: 112-119.
- DE LA BAUME, S.; GROS, C.; YI, C.C.; CHAILLET, P.; MARCAIS-COLLADO, H. y col. (1982). Selective participation of both "enkephalinase" and aminopeptidase activities in the metabolism of endogenous enkephalins. *Life Sci.* 31: 1753-1756.

- DEL POZO, E.; CARO, G. y BAEYENS, J.M. (1987). Analgesic effects of several calcium channel blockers in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 137: 155.
- DETH, R. y VAN BREEMEN, C. (1977). Agonist induced release of intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  in the rabbit aorta. *J. Membr. Biol.* 30: 937-943.
- DEYO, S.N.; SWIFT, R.M. y MILLER, R.J. (1979). Morphine and endorphins modulate dopamine turnover in rat median eminence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 3006-3009.
- DIERSEN, M.; FLOREZ, J. y HURLE, M.A. (1990). Calcium channel modulation by dihydropyridines modifies sufentanil-induced antinociception in acute and tolerant conditions. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 342: 559-565.
- DINGLELINE, E. y GOLDSTEIN, A. (1975). Single neuron studies of opiate action in the guinea pig myenteric plexus. *Life Sci.* 17: 57-62.
- DINGLELINE, E. y GOLDSTEIN, A. (1976). Effect of synaptic transmission blockade on morphine action in the guinea pig myenteric plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196: 97-106.
- DINGLELINE, E.; GOLDSTEIN, A. y KENDIG, J. (1974). Effects of narcotic opiates and setonin on the electrical behaviour of neurons in the guinea pig myenteric plexus. *Life Sci.* 14: 2299-2309.
- DINGLELINE, E.; IVERSEN, L.L.; y BREUKER, E. (1978). Naloxone as a GABA antagonist: Evidence from iontophoretic, receptor binding and convulsant studies. *Eur. J. Pharmacol.* 47: 19-27.
- DOLIN, S.J.; LITTLE, H.J.; HUDSPITH, M.; PAGONIS, C. y LITTLETON, J. (1987). Increased dihydropyridine-sensitive calcium channels in rat brain may underlie ethanol physical dependence. *Neuropharmacology* 26: 275-279.
- DOMINO, E.F. y WILSON, A.E. (1973). Enhanced utilization of brain acetylcholine during morphine withdrawal in the rat. *Nature* 243: 285-286.
- DONERER, J. y LEMBECK, F. (1985). New models for the evaluation of opioid effects in the guinea pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 85: 61-64.
- DOUGALL, I.G. y LEFF, F. (1987). Pharmacological analysis of the calcium-dependence of  $\mu$ -receptor agonism. *Br. J. Pharmacol.* 92:723-731.

- DOUGLAS, W.W. (1968). Stimulus-secretion coupling: The concept and clues from chromaffin and other cells. *Br. J. Pharmacol.* 34: 451-474.
- DUGGAN, A.W.; NORTH, R.A. (1983). Electrophysiology of opioids. *Pharmacol. Rev.* 35: 219-281.
- DUNWIDDIE, T.; JOHNSON, K.I. y PROCTOR, W.R. (1987). Bremazocine differentially antagonizes responses to selective  $\mu$  and  $\delta$  opioid receptor agonists in rat hippocampus. *Br. J. Pharmacol.* 91: 523-530.
- EBASHI, S. (1980). Regulation of muscle contraction. *Proc. R. Soc. Lond.* 207: 259-286
- ECKERT, R. y CHAD, J.E. (1984). Inactivation of  $Ca^{++}$  channels. *Prog. Biophys. Biol.* 44: 215-267.
- EHRENPREIS, S.; GREENBERG, J. y COMATY, J.E. (1975). Mechanism of development of tolerance to injected morphine by guinea pig ileum. *Life Sci.* 17: 49-54.
- EIDELBERG, E. (1976). Possible actions of opiates upon synapses. *Prog. Neurobiol.* 6: 81-102.
- EISENMAN, A.J.; FRASER, H.F.; SLOAN, J. y ISBEU, H. (1958). Urinary 17-ketosteroid excretion during a cycle of addiction to morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 124: 305-311.
- FERRI, S.; REINA, R. y SANTAGOSTINO, A. (1977). Dopamine and the depressant action of morphine on stimulated guinea pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 59: 25-28.
- FIELDING, S.; WILKER, J.; HYNES, M.; SZEWCZAK, M.; NOVICK, W.J. Jr. y LAL, H. (1978). A comparison of clonidine with morphine for antinociceptive and antiwithdrawal actions. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 899-905.
- FLAIM, S.F.; RATZ, P.H.; SWIGART, S.C. y GLEASON, M.M. (1985). Bepredil hydrochloride alters potential-dependent and receptor operated calcium channels in vascular smooth muscle of rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 63-71.
- FLECKENSTEIN, A. (1981). Pharmacology and electrophysiology of calcium antagonists. En: ZANCHETTI, A. y KRIKLER, D.M. (eds.) *Calcium antagonists cardiovascular therapy: experience with verapamil*, Amsterdam, Oxford, Princeton, Excerpta Medica, pp. 10-29.

- FLECKENSTEIN, A.; KAMMERMEIER, A.; DORING, A. y FREUND, H.J. (1967). Mechanismus neuartiger koronardilatoren mit gleich zeitig Sauerstoff-einsparenden, myokard-effekten, Prenylamin und Iproveratril. *Z. Kreislanfforsch.* 56: 716-744, 839-853.
- FLECKENSTEIN, A.; TRITTHART, H.; FLECKENSTEIN, B.; HERBST, A. y GRÜN, G. (1969). Eine nene gruppe kompetitiver  $Ca^{++}$ -antagonisten (iproveratril, D600, prenylamin) mit starken hemmeffekten anf die elektromechanische koppelung in warmblüter-myokard. *Pflügers Arch. Suppl.* 307: R25.
- FLEMING, W.W. (1976). Variable sensitivity of excitable cells: possible mechanisms and biological significance. *Rev. Neurosci.* 2: 43-90.
- FLEMING, W.W. (1984). A review of postjunctionl supersensitivity in cardiac muscle. En: FLEMING, W.W.; GRAEFE, K.-H.; LANGER, S.Z. y WINER, N. (eds.) *Neuronal and extraneuroanl events in Autonomic Pharmacology*, New York, Raven Press.
- FLEMING, W.W.; McPHILLIPS, J.J. y WESTFALL, D.P. (1973). Postjunctional supresensitivity and subsensitivity of excitable tissues to drugs. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 68: 56-119.
- FLEMING, W.W. y WESTFALL, D.P. (1988). Adaptive supersensitivity. En TENDELENBURG, U. y WEINER, N. (eds.) *Handbook of Experimental Pharmacology 90/I, Catecholamines I*, West Germany, Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 509-559.
- FLOREZ, J.; ARMIJO, J.A. y MEDIAVILLA, A. (1980). Mecanismos generales de acción de los fármacos. En: *Farmacología humana*, 5 ed. Pamplona, Ediciones Universidad de Navarra. pp. 21-41.
- FOOTE, S.L.; BLOOM, F.E. Y ASTON-JONES, G. (1983). Nucleus *locus coeruleus*: new evidence of of anatomical and physiological specifity. *Physiol. Rev.* 63: 844-914.
- FOSSET, M.; JAIMOVICH, E.; DELPONT, E. y LAZDUNSKI, M. (1983). [ $^3H$ ]nitrendipine receptors in skeletal muscle. Properties and preferential localization in transverse tubules. *J. Biol. Chem.* 258: 6086-6092.
- FRANCIS, D.L.; ROY, A.C. y COLLIER, H.O.J. (1975). Morphine abstinence and quasi-abstinence effects after phosphodiesterase inhibition and naloxone. *Life Sci.* 16: 1901-1906.

- FRANCO, R.; COSTA, M. y FURNESS, J.B. (1979). Evidence for the release of endogenous substance P from intestinal nerves. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 306: 195-201.
- FRANZ, D.N.; HARE, B.D. y McCLOSEKY, K.L. (1982). Spinal sympathetic neurons: possible sites of opiate withdrawal suppression by clonidine. *Science* 215: 1643-1645.
- FRENCH, E.D. y WILLIAMS, J.T. (1989). Electrophysiological analysis of opiod peptides: extracellualar and intracellular approaches. *Methods Enzymol.* 168: 103-129.
- FREDERICKSON, R.C.A.; HEWES, C.R. y AIKEN, J.W. (1976). Correlation between the *in vivo* and *in vitro* expression of opiate withdrawal precipitated by naloxone: their antagonism by l-(-)- $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199: 375-384.
- FREDERICKSON, R.C.A. y NORRIS, E.H. (1976). Enkephalin-induced depression of single neurons in brain areas with opiate receptors-antagonism by naloxone. *Science* 194: 440-442.
- FRY, J.P.; HERZ, A. y ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1978). Non-specific actions of opioids in the rat hippocampus. *J. Physiol.* 280: 15P.
- FRY, J.P.; HERZ, A. y ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1980a). Development of acute opioid tolerance and dependence in rat striatal neurones. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 313: 145-149.
- FRY, J.P.; HERZ, A. y ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1980b). A demonstration of naloxone-precipitated opiate withdrawal on single neurones in the morphine-tolerant/dependent rat brain. *Br. J. Pharmacol.* 68: 585-592.
- FURNESS, J.B. y COSTA, M. (1987). *The Enteric Nervous System*, Edinburgh, Churchill Livingstone.
- GADDUM, J.H. y PICARELLI, Z.P. (1957). Two kinds of tryptamine receptors. *Br. J. Pharmacol.* 12: 323-328.
- GAHWILER, B.H. (1981). Development of acute tolerance during exposure of hippocampal explants to an opioid peptide. *Brain Res.* 217: 196-200.
- GALLAGER, D.W. y AGHAJANIAN, G.K. (1976). Effect of antipsychotic drugs on the firing

- of dorsal raphe cells. I. Role of adrenergic system. *Eur. J. Pharmacol.* 39: 341-355.
- GALLIGAN, J.J.; SUPRENANT, A.; TONINI, M. y NORTH, R.A. (1988). Differential localization of 5-HT<sub>1</sub> receptors on myenteric and submucosal neurons. *Am. J. Physiol.* 255: G603-G611.
- GANDHI, V.C. y ROSS, D.H. (1988). The effect of  $\kappa$  agonist U50,488H on [<sup>3</sup>H] nimodipine receptor binding in rat brain regions. *Eur. J. Pharmacol.* 150: 51-57.
- GARCIA-SEVILLA, J.A.; UGEDO, I.; ULIBARRI, I.; ELIZAGARATE, E. y GUTIERREZ, M. (1984). Heroin addicts have increased platelet alpha-2 adrenoceptor densities which correlate with the severity of the abstinence syndrome. *Eur. J. Pharmacol.* 100: 131-132.
- GARCIA-SEVILLA, J.A.; UGEDO, I.; ULIBARRI, I.; ELIZAGARATE, E. y GUTIERREZ, M. (1985). Platelet alpha-2 adrenoceptors in heroin addicts during withdrawal and after treatment with clonidine. *Eur. J. Pharmacol.* 114: 365-374.
- GEARY, W.A. y WOOTEN, G.F. (1985). Regional saturation studies of 3H-naloxone binding in the naive, dependent and withdrawal states. *Brain Res.* 360: 214-223.
- GENGO, P.J.; YOUSIF, F.; JANIS, R.A. y TRIGGLE, D.J. (1984). Interaction of phenoxybenzamine with muscarinic receptors and calcium channels. *Biochem. Pharmacol.* 33: 3445-3449.
- GESSA, G.L.; VARGIN, L.; BIGGIO, G. y TOGLIAMONTE, A. (1973). Effect of methadone on brain dopamine metabolism. En: USDIN, E. y SNYDER, S.H. (eds.) *Frontiers in Catecholamine Research*, New York, Pergamon Press, pp. 1011-1014.
- GIARMAN, N.J. y PEPEU, G. 1962. Drug-induced changes in brain acetylcholine. *Br. J. Pharmacol.* 19: 226-234.
- GIANUTSOS, G.; HAYNES, M.D.; PURI, S.K.; DRAWBAUGH, R.B. y LAL, H. (1974). Effect of apomorphine and nigrostriatal lesions on aggression and striatal dopamine turnover during morphine withdrawal: Evidence for dopaminergic supersensitivity in protracted abstinence. *Psychopharmacologia* 34: 37-44.
- GILLAN, M.G.C.; KOSTERLIZ, H.W.; ROBSON, L.E. y WATERFIELD, A.A. (1979). The inhibitory effects of presynaptic alpha-adrenoceptor agonist on contractions of guinea-pig ileum and mouse vas deferens in the morphine-dependent and

- withdrawn states produced *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 66: 601-608.
- GILMAN, A.G. (1987). G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 615-649.
- GINTZLER, A.R. (1980). Substance P involvement in the expression of gut dependence on opiates. *Brain Res.* 182: 224-228.
- GINTZLER, A.R. y HYDE, D. (1984). Unmasking myenteric *delta* receptors. *Life Sci.* 33: 323-325.
- GINTZLER, A.R. y SCALISI, J.A. (1982). Effects of opioids on noncholinergic excitatory responses of the guinea pig isolated ileum: inhibition of release of enteric substance P. *Br. J. Pharmacol.* 75: 199-205.
- GLOSSMANN, H. y FERRY, D.R. (1985). Assay for calcium channels. *Methods Enzymol.* 109: 513-551.
- GLOSSMANN, H.; FERRY, D.R.; LUBBECKE, F.; NEWES, R. y HOFMANN, F. (1982). Calcium channels: direct identification with radioligand binding studies. *Trends Pharmacol. Sci.* 3: 431-437.
- GLOSSMANN, H.; GOLL, A.; ROMBUSH, M. y FERRY, D.R. (1985). Molecular pharmacology of  $Ca^{++}$  channels receptor binding studies. En: BETZ, E.; DECK, K. y HOFFMEISTER, F. (eds.) *Nimodipine pharmacological and clinical properties*. Stuttgart. Schattower Verlag, pp. 57-73.
- GODFRAIND, T. (1981). Mechanism of action of calcium entry blockers. *Fed. Proc.* 40: 2866-2871.
- GODFRAIND, T. (1987). Classification of calcium antagonists. *Am. J. Cardiol.* 59: 11B-23B.
- GODFRAIND, T. y KABA, A. (1969a). Blockade or reversal of the contraction induced by calcium and adrenaline in depolarized arterial smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 36: 549-560.
- GODFRAIND, T. y KABA, A. (1969b). Inhibition by cinnarizine and chlorpromazine on the contraction induced by calcium and adrenaline in vascular smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 35: 354P-355P.



- GODFRAIND, T.; MILLER, R. y WIBO, M. (1986). Calcium antagonism and calcium entry blockade. *Pharmacol. Rev.* 38: 324-393.
- GODFRAIND, T.; STURBOIS, X. y VERBEKE, N. (1976). Calcium incorporation by smooth muscle microsomes. *Biochem. Biophys. Acta* 455: 254-268.
- GODFRAIND, T. y WIBO, M. (1985). Subcellular localization of [<sup>3</sup>H]nitrendipine binding sites in guinea-pig ileal smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 85: 335-340.
- GOLD, M.S.; REDMOND, D.E. y KEBER, H.D. (1978). Clonidine in opiate withdrawal. *Lancet II*: 599-602.
- GOLDSTEIN, A. y SCHULZ, R. (1973). Morphine-tolerant longitudinal muscle strip from guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 48: 655-666.
- GOLDSTEIN, A.; TACHIBANA, S.; LOWNY, L.I.; HUNKAPILLER, M. y HOOD, L. (1979). Dynorphin (1-13), an extraordinary potent opioid peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 6666-6670.
- GOODMAND, R.R. y SNYDER, S.H. (1982a). Autoradiographic localization of *kappa* opiate receptors to deep layers of the cerebral cortex may explain unique sedative and analgesic effects. *Life Sci.* 31: 1291-1294.
- GOODMAND, R.R. y SNYDER, S.H. (1982b). *Kappa* opiate receptors localized by autoradiography to deep layers of cerebral cortex: Relation to sedative effects. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 5703-5707.
- GOODMAN, R.R.; SNYDER, S.H.; KUCHAR, M.S. y YOUNG, W.S. (1980). Differentiation of *delta* and *mu* opiate receptor localizations by light microscopic autoradiography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 6239-6243.
- GOULD, R.J.; MURPHY, K.M.M. y SNYDER, S.H. (1982). [<sup>3</sup>H]-nitrendipine labeled calcium channels discriminate inorganic calcium agonists and antagonists. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79: 3656-3660.
- GRANT, S.J.; HUANG, Y.H. y REDMOND, D.E. (1988). Behaviour of monkeys during opiate withdrawal and *locus coeruleus* stimulation. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 30: 13-19.
- GRAZIANO, M.P. y GILMAN, A.G. (1987). Guanine nucleotide-binding regulatory proteins: mediators of transmembrane signalling. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 478-

481.

- GREBB, J.A. (1986). Nifedipine and flunarizine block amphetamine-induced behavioral stimulation in mice. *Life Sci.* 38: 2375-2381.
- GREGA, D.S.; WERZ, M.A. y MACDONALD, R.L. (1987). Forskolin and phorbol esters reduce the same potassium conductance of mouse neurons in culture. *Science* 235: 345-348.
- GREEN, A.R.; DE SOUZA, R.J.; DAVIES, E.M. y CROSS, A.J. (1990). The effects of  $Ca^{2+}$  antagonists and hydralazine on central 5-hydroxytryptamine biochemistry and function in rats and mice. *Br. J. Pharmacol.* 99: 41-46.
- GREENBERG, D.A.; COOPER, E.C. y CARPENTER, C.L. (1985). Reversible dihydropyridine isothiocyanate binding to brain calcium channels. *J. Neurochem.* 44: 319-321.
- GRIFFIN, M.T.; LAW, P.Y. y LOH, H.H. (1983). Modulation of adenylate cyclase activity by a cytosolic factor following chronic opiate exposure in neuroblastoma x glioma NG108-15 cells. *Life Sci.* 33: 365-368.
- GRIFFIN, M.T.; LAW, P.Y. y LOH, H.H. (1985). Involvement of both inhibitory and stimulatory guanine nucleotide binding proteins in the expression of chronic opiate regulation of adenylate cyclase activity in NG108-15 cell. *J. Neurochem.* 45: 1585-1589.
- GROSS, R.A. y MACDONALD, R.L. (1987). Dynorphin A selectively reduces a large transient (N-type) calcium current of mouse dorsal root ganglion neurons in cell culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5469-5473.
- GROVER, A.K.; KWAN, C.Y.; LUCHOWSKI, E.; DANIEL, E.E. y TRIGGLE, D.J. (1984). Subcellular distribution of [ $^3H$ ]nitrendipine binding in smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 259: 2223-2226.
- GUMULKA, S.W.; DINNENDAHL, V. y SCHONGHOFER, P.S. (1979). The effect of naloxone on cerebellar cGMP content. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 306:169-172.
- GUNNE, L.M. (1959). Noradrenaline and adrenaline in the rat brain during acute and chronic morphine administration and during withdrawal. *Nature* 184: 1950-1951.

- GUNNE, L.M. (1963). Catecholamines and 5-hydroxytryptamine in morphine tolerance and withdrawal. *Acta. Physiol. Scand.* 58(Suppl. 204):1.
- GUYTON, A.C. (1987). Histología del músculo liso. En: *Tratado de Fisiología Médica* 6 ed., Mexico D.F., Interamericana, pp. 1172-183.
- HAMBURG, M. y TALLMAN, J.F. (1981). Chronic morphine administration increases the apparent number of  $\alpha_2$ -adrenergic receptors in rat brain. *Nature* 291: 493-495.
- HAMMOND, M.D.; SCHNEIDER, C. y COLLIER, H.O.J. (1976). Induction of opiate tolerance in isolated guinea-pig ileum and its modification by drugs. En: KOSTERLITZ, H.W. (ed.) *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*, Amsterdam, Elsevier/North Holland Biomedical Press, pp. 169-176.
- HANO, K.; KANETO, H. y KAKUNAGA, T. (1964). The administration of morphine and changes in acetylcholine metabolism in mouse brain. *Biochem. Pharm.* 13: 441-447.
- HARDEN, T.K. (1983). Agonist induced desensitization of the  $\beta$ -adrenergic receptor links adenylate cyclase. *Pharmacol. Rev.* 35: 5-32.
- HARRIS, R.A.; LOH, H.H. y WAY, E.L. (1975). Effects of divalent cations, cation chelators and a ionophore on morphine analgesia and tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 195: 488.
- HARRIS, R.A.; LOH, H.H. y WAY, E.L. (1976). Antinociceptive effects of lanthanum and cerium in non-tolerant and morphine tolerant-dependent animals. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 196: 288.
- HAGIWARA, S. (1973).  $\text{Ca}^{2+}$  spike. *Adv. Biophys.* 4: 71-102.
- HAUBRICH, D.R. y BLAKE, D.E. (1973). Modification of serotonin metabolism in rat brain after acute or chronic administration of morphine. *Biochem. Pharmacol.* 22: 2753-2759.
- HAWTHORN, M.J.; TAYLOR, D.A. y FLEMING, W.W. (1987). Characteristics of adaptive supersensitivity in the left atrium of the guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241: 453-457.
- HEILBRUNN, L.V. y WIERCINSKI, F.J. (1947). The action of various cations on muscle protoplasm. *J. Cell. Comp. Physiol.* 29: 15-32.

- HENDRY, I.A.; DUGGAN, A.W.; y HALL, J.G. (1987). Morphine dependence in the rat: the appearance in the spinal cord of a dorsal root ganglion cell neurotrophic factor. *J. Neurosci. Res.* 18: 439-442.
- HENDERSON, G.; HUGHES, H. y KOSTERLITZ, H.W. (1972). A new example of a morphine-sensitive neuroeffector junction: adrenergic transmission in the mouse vas deferens. *Br. J. Pharmacol.* 46: 764-766.
- HESS, P.; LANSMAN, J.B. y TSIEN, R.W. (1984). Different modes of Ca channel gating behaviours favoured by dihydropyridine Ca agonists an antagonists. *Nature* 311: 538-544.
- HIMMSELBACH, C.K. (1939). Studies of certain addiction characteristics of: (a) dihydromorphine ("paramorphan"), (b) dihydrodesoxymorphine-d ("desomorphine"), (c) dihydrodesoxycodine-d ("desocodine"), (d) methyldihydromorphinone ("metopan"). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 67: 239-249.
- HIRNING, L.D.; FOX, A.P.; McCLESKY, E.W.; OLIVERA, B.M.; THAYER, S.A.; MILLER, R.J. y TSIEN, R.W. (1988). Dominant role of N-type  $Ca^{++}$  channels in evoked release of norepinephrine from sympathetic neurons. *Science* 239: 57-61.
- HIRST, G.D.S.; HOLMAN, M.E. y SPENCE, I. (1974). Two types of neurones in tyhe myenteric plexus of duodenum in the guinea-pig. *J. Physiol.* 236: 303-326.
- HITZEMAN, R.J.; HITZEMAN, B.A. y LOH, H.H. (1974). Binding of  $^3H$ -naloxone in the mouse brain: Effects of ions and tolerance development. *Life Sci.* 14: 2393-2404.
- HO, I.K.; LOH, H.H. y WAY, E.L. (1973c). Influence of 5,6-dihydroxytryptamine on morphine tolerance and physical dependence. *Eur. J. Pharmacol.* 21: 331-336.
- HO, I.K.; LU, S.E.; STOLMAN, S.; LOH, H.H. y WAY, E.L. (1972). Influence of p-chlorophenylalanine on morphine tolerance and physical dependence and regional brain serotonin turnover studies in morphine tolerant-dependent mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 182: 155-165.
- HOFMANN, F.; NASTAINEZYK, W.; RÖHRKASTEN, A; SCHVERDER, T. y SIEBER, M. (1987). Regulation of the L-type calcium channel. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 393-398.
- HOFFMEISTER, F.; BENZZ, U. y HEISE, A. (1982). Behavioural effects of nimodipine in animals. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 32: 247-260.

- HÖLLT, V. (1986). Opioid peptide processing and receptor selectivity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 26: 59-77.
- HÖLLT, V.; DUM, J.; BLASIG, J.; SCHUBERT, P. y HERZ, A. (1975). Comparison of *in vivo* and *in vitro* parameters of opiate receptor binding in mouse and tolerant-dependent rodents. *Life Sci.* 16: 1823-1828.
- HOLZER, P. (1984). Characterization of the stimulus-induced release of immunoreactive substance P from the myenteric plexus of the guinea pig small intestine. *Brain Res.* 297: 127-136.
- HONDEGHEM, L. y KATZUNG, B. (1984). Anthyarrhythmic agents: The modulated receptor mechanisms of action of sodium and calcium channels blocking agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 24: 387-423.
- HORNE, P.; TRIGGLE, D.J. y VENTER, J.C. (1984). Nitrendipine and isoproterenol induce phosphorylation of a 42,000 dalton protein that comigrates with the affinity labelled calcium channel regulatory subunit. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 121: 890-898.
- HOWES, J.F.; HARRIS, L.S. y DEWEY, W.L. (1970). The effect of morphine, nalorphine, naloxone, pentazocine, cyclazocine and oxotremorine on the synthesis and release of acetylcholine by mouse cerebral cortex slices *in vitro*. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 184:267-276.
- HUCTCHINSON, M.; KOSTERLITZ, H.W.; LESLIE, F.M.; WATERFIELD, A.A. y TERENIUS, L. (1975). Assessment in the guinea-pig ileum and mouse vas deferens of benzomorphans which have strong antinociceptive activity but do not substitute for morphine in the dependent monkey. *Br. J. Pharmacol.* 55: 541-546.
- HUGHES, J. (1975). Isolation of an endogenous compound from the brain with pharmacological properties similar to morphine. *Brain Res.* 88: 295-308.
- HUGHES, J.; SMITH, T.W. ; KOSTERLITZ, H.W.; FOTHERGILL, L.A.; MORGAN, B.A. y MORRIS, H.R. (1975). Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity. *Nature* 258: 577-579.
- HUIDOBRO-TORO, J.P; HU, J. y WAY, E.L. (1981). Calcium antagonism of the inhibitory effect of normorphine on the ileum of the morphine tolerant and nontolerant guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 218: 84-91.

- HUIDOBRO-TORO, J.P.; ZHU, Y.-X.; LEE, N.M.; LOH, H.H. y WAY, E.L. (1984). Dynorphin inhibition of the neurotensin contractile activity on the myenteric plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 228: 293-303.
- HYNES, M.D.; McCARTEN, M.D.; SHEARMAN, G. y LAL, H. (1978). Differential reduction of morphine-withdrawal body shakes by butaclamol enantiomers. *Life Sci.* 22: 133-136.
- HYNES, M.D.; SHEARMAN, G. y LAL, H. (1980). Alterations in brain GABA fail to influence morphine withdrawal body shakes. *Brain Res. Bull.* 5(2): 805-808.
- ILHAN, M. y LONG, J.P. (1985). Clonidine-induced desensitization differentiates presynaptic alpha-2 adrenoceptors of the guinea-pig ileum and rat vas deferens. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 275: 199-207.
- ITZHAK, Y.; BONNET, K.A.; GROTH, J.; HILLER, J.M. y SIMON, E.J. (1982). Multiple opiate binding sites in human brains regions: Evidence for kappa and sigma sites. *Life Sci.* 31: 1363-1366.
- JAFFE, J.H.; KANZLER, M.; BRADY, R. y FRIEDMAN, L. (1982). Methodology for assessing agents that suppress methadone withdrawal: a study of baclofen. In *Problems of Drug Dependence, 1981*. ed. L. S. Harris, pp 269-275. NIDA Res. Monogr. 41, Rockville, Md.
- JAFFE, J.H. y MARTIN, W.R. (1986). Analgésicos y antagonistas opiáceos. En: GOODMAN, A. y GILMAN, L.S. (eds.) *Las bases farmacológicas de la terapéutica*, Panamericana, Madrid, pp. 473-509.
- JEITNER, T. y COSTA, M. (1989). Isolation of myenteric ganglia from guinea-pig small intestine. *Neurosci. Lett.* 34 (suppl.): 101.
- JHAMANDAS, K. y SUTAK, M. (1980). Action of enkephalin analogues and morphine on brain acetylcholine release: Differential reversal by naloxone and an opiate pentapeptide. *Eur. J. Pharmacol.* 71: 201-210.
- JOHANSON, S.M.; WILLIAMS, J.T.; COSTA, M. y FURNESS, J.B. (1987). Naloxone-induced depolarization and synaptic activation of myenteric neurons in morphine-dependent guinea pig ileum. *Neurosci.* 21: 595-602.
- JOHNSON, M.A.; HILL, R.G. y HUGHES, J. (1988). A possible role for prostaglandins in the expression of morphine dependence in guinea-pig isolated ileum. *Br. J.*

*Pharmacol.* 93: 932-936.

- JOHNSON, S.M.; COSTA, M. y HUMPREYS, C.M. (1989b). Opioid dependence in myenteric neurons innervating the circular muscle of guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 339: 166-172.
- JOHNSON, S.M. y DUGGAN, A.W. (1981a). Tolerance and dependence of dorsal horn neurones of the cat: the role of the opiate receptors of the substantia gelatinosa. *Neuropharmacology* 20: 1033-1038.
- JOHNSON, S.M. y DUGGAN, A.W. (1984). Dependence in the absence of tolerance to morphine. *Eur. J. Pharmacol.* 97: 305-308.
- JOHNSON, S.M. y FLEMING, W.W. (1989). Mechanism of cellular adaptive sensitivity changes: applications to opioid tolerance and dependence. *Pharmacol. Rev.* 41: 435-488.
- JOHNSON, S.M.; HUMPREYS, C.M. y COSTA, M. (1987a). Sustained nerve-mediated contractions of guinea-pig ileum during morphine withdrawal by washout. *Eur. J. Pharmacol.* 141: 41-50.
- JOHNSON, S.M. y NORTH, R.A. (1980). Membrane potential changes in neurones undergoing withdrawal from opiates. *Brain. Res.* 190: 559-563.
- JOHNSON, S.M.; PILLAI, N.P. y COSTA, M. (1989a). Lack of effect of forskolin on the inhibitory actions of (D-al<sup>2</sup>, N-Me-phe<sup>4</sup>, gly<sup>5</sup>-ol)-enkephalin on myenteric neurons of guinea-pig ileum. *Adv. Biosc.* 75: 169-172.
- JOHNSON, S.M.; WESTFALL, D.P.; HOWARD, S.A. y FLEMING, W.W. (1978). Sensitivities of the isolated ileal longitudinal smooth muscle-myenteric plexus and hypogastric nerve-vas deferens of the guinea pig after chronic morphine pellet implantation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 204: 54-66.
- JOHNSON, S.M.; WILLIAMS, J.T.; COSTA, M. y FURNESS, J.B. (1987b). Naloxone-induced depolarization and synaptic activation of myenteric neurons in morphine-dependent guinea pig ileum. *Neuroscience* 21: 595-602.
- KAKUNAGA, T.; KANETO, H y HANO, K. (1966). Pharmacological studies of analgesics - VII. Significance of the calcium ion in morphine analgesia. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 153: 134-141.
- KAMADA, T. y KINOSITA, H. (1943). Disturbances initiated from naked surfaced of

muscle protoplasm. *Jpn. J. Zool.* 10: 469-493.

KANAYA, S.; ARLOCK, P.; KATZUNG, B.G. y HONDEGHEM, L. (1983) Diltiazem and verapamil preferentially block inactivated cardiac calcium channels. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 15: 145-148.

KAPLITA, P.V. y TRIGGLE, D.J. (1982). Action of  $Ca^{++}$  antagonists on the guinea-pig ileal myenteric plexus preparation. *Biochem. Pharmacol.* 32: 65-68.

KARRAS, P.J. y NORTH, R.A. (1981). Acute and chronic effects of opiates on single neurons of the myenteric plexus. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 217: 70-80.

KAUFFMAN, R.; BAYER, R.; RODENLIERRCHEN, P. y MANNHOLD, R. (1982). Differentiation of calcium antagonistic drugs with respect to their myocardial effects. En: KALTENBACH, M. y EPSTEIN, S. (eds.) *Hypertrophic cardiomyopathy*, Berlin, Springer Verlag, pp. 276-284.

KAVALIERS, M. (1987). Calcium channel blockers inhibit the antagonistic effect of Phe-Met-Arg-Phe amide (FMRFamide) on morphine and stress-induced analgesia in mice. *Brain Res.* 415: 380-384.

KAZDA, S. y TOWART, R. (1982). Nimodipine: a new calcium antagonistic drug with a preferential cerebrovascular action. *Acta Neurochir.* 63: 259-265.

KATZ, B. y MILEDI, R. (1970). Further study of the role of calcium in synaptic transmission. *J. Physiol.* 207: 789-801.

KATZ, B. y THESLEFF, S. (1957). A study of the desensitization produced by acetylcholine at the motor end-plate. *J. Physiol.* 138: 63-80.

KELLY, E. y NAHORSKI, S.R. (1986). Specific inhibition of dopamine D-1-mediated cyclic AMP formation by dopamine D-2, muscarinic cholinergic, and opiate receptor stimulation in rat striatal slices. *J. Neurochem.* 47: 1512-1516.

KENDALL, D.A. y NAHORSKI, S.R. (1985). Dihydropyridine calcium channel activators and antagonists influence depolarization-evoked inositol phospholipid hydrolysis in brain. *European J. Pharmacol.* 115: 31-36.

KITANO, T. y TAKEMORI, A.E. (1977). Enhanced affinity of opiate receptors for naloxone in striatal slices of morphine-dependent mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 18: 341-351.



- KLEE, W.A. y NIRENBERG, M.A. (1974). A neuroblastoma x glioma hybrid cell line with morphine receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 71: 3474-3477.
- KLEE, W.A.; SHARMA, S.H. y NIRENBERG, M. (1975). Opiate receptors as regulators of adenylyl cyclase. *Life Sci.* 16: 1869-1874.
- KLEE, W.A. y STREATY, R.A. (1974). Narcotic receptor sites in morphine dependent rats. *Nature* 248: 61-63.
- KLEINBLOESEM, C.H.; VAN BRUMMELEN, P.; VAN DE LINDE, J.A.; VOOGD, P.J. y BREIMER, D.D. (1984). Nifedipine: Kinetics and dynamics in healthy subjects. *Clin. Pharmacol. Ther.* 35,6: 742-797.
- KNAPP, S.; MANDEL, A.J. y BULLARD, W.P. (1975). Calcium activation of brain tryptophan hydroxylase. *Life Sci.* 16: 1583-1594.
- KOKUBUN, S. y REUTER, H. (1984). Dihydropyridine derivatives prolong the open state of Ca channels in cultured cardiac cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81: 4824-4827.
- KORF, J.; BUNNEY, B.S.; AGHAJANIAN, G.K. (1974). Noradrenergic neurons: Morphine inhibition of spontaneous activity. *Eur. J. Pharmacol.* 25: 165-169.
- KOSTERLITZ, H.W.; LORD, J.A.; PATERSON, S.J. y WATERFIELD, A.A. (1980). Effects of changes in the structure of enkephalins and of narcotic analgesic drugs on their interactions with *mu*- and *delta*-receptors. *Br. J. Pharmacol.* 68: 333-342.
- KOSTERLITZ, H.W. y ROBINSON, J.A. (1958). The inhibitory action of morphine on the contraction of the longitudinal muscle coat of the isolated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 13: 296-303.
- KOSTERLITZ, H.W. y WATT, A.J. (1968). Kinetic parameters of narcotic agonists and antagonists with particular reference to N-allylnoroxymorphone (naloxone). *Br. J. Pharmacol.* 33: 266-276.
- KROMER, W.; STEIGEMANN, N. y SHEARMAN, G.T. (1982). Differential effects of SKF-10,047 (N-allyl-normetazocine) on peristalsis and longitudinal muscle contractions of the isolated guinea-pig ileum. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 321: 218-222.

- KUHAR, M.J.; PERT, C.B. y SNYDER, S.H. (1973). Regional distribution of opiate receptor binding in monkey and human brain. *Nature* 245: 447-450.
- KUROSE, H.; KATADA, T.; AMANO, T. y UI, M. (1983). Specific uncoupling by islet-activating protein, pertussis toxin, of negative signal transduction via alpha-adrenergic, cholinergic and opiate receptors in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Biol. Chem.* 258: 4870-4875.
- KUSCHINSKY, K. y HORNYKIEWICZ, O. (1974). Effects of morphine on striatal dopamine metabolism: Possible mechanism of its opposite effect on locomotor activity in rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.* 26: 41-50.
- LAL, H. y HYNES, M.D. (1978). Effectiveness of butyrophenones and related drugs in narcotic withdrawal. En: DENIKER, P.; RADOUCO-THOMAS, C.; VILLENEUVE, A.; BARONET-LACROIX, D. y GARCIN, F. (eds.) *Neuro-psychopharmacology*, Toronto, Pergamon, pp. 289-295.
- LAMPERT, A.; NIRENBERG, M. y KLEE, W.A. (1976). Tolerance and dependence evoked by an endogenous opiate peptide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 3165-3167.
- LANGER, S.Z. (1981). Presynaptic regulation of the release of catecholamines. *Pharmacol. Res.* 32: 337.
- LANSMAN, J.B.; HESS, P. y TSIEN, R.N. (1986). Blockade of current through single calcium channels by  $\text{Cd}^{++}$ ,  $\text{Mg}^{++}$  and  $\text{Ca}^{++}$ . Voltage and concentration dependence of calcium entry into the pore. *J. Gen. Physiol.* 88: 321-347.
- LARGE, W.A. y MILTON, A.S. (1970). The effect of acute and chronic morphine administration on brain acetylcholine levels in the rat. *Br. J. Pharmacol.* 38: 451-452.
- LAVERTY, R. y ROTH, R.H. (1980). Clonidine reverses the increased norepinephrine turnover during morphine withdrawal in rats. *Brain Res.* 182: 482-485.
- LAW, P.Y.; WU, J.; KOEHLER, J.E. y LOH, H.H. (1981). Demonstration and characterization of opiate inhibition of the strial adenylate cyclase. *J. Neurochem.* 36: 1834-1846.
- LAW, P.Y.; HOM, D.S. y LOH, H.H. (1983). Opiate regulation of adenosine 3',5'-cyclic monophosphate level in neuroblastoma x glioma NG108-15 hybrid cells: relationships between receptor occupancy and effect. *Mol. Pharmacol.* 23: 26-35.

- LEE, C.Y.; AKERA, T.; STOLMAN, S. y BRODY, T.M. (1975). Saturable binding of dihydromorphine and naloxone to rat brain tissue *in vitro*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 194: 583-592.
- LEFKOWITZ, R.J. y CARON, M.G. (1986). Regulation of adrenergic receptor function by phosphorylation. *J. Mol. Cell Cardiol.* 18: 885-895.
- LESLIE, F.M.; CHAVKIN, C. y COX, B.M. (1980). Opioid binding properties of brain and peripheral tissues: evidence for heterogeneity in opioid ligand binding sites. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214: 395-402.
- LEWIS, M.E.; KHACHATURIAN, H. y WATSON, S.J. (1983a). Comparative distribution of opiate receptors and three opioid peptide neuronal systems in rhesus monkey central nervous system. *Life Sci.* 33: 239-242.
- LEWIS, M.E.; PERT, A.; PERT, C.B. y HERKENHAM, M. (1983b). Opiate receptor localization in rat cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 216: 339-358.
- LITT, I.F.; COLLI, A.S. y COHEN, M.I. (1971). Diazepam in the management of heroin withdrawal in adolescents: Preliminary report. *J. Pediatr.* 78(4): 692-696.
- LLINAS, R.; SUGIMORI, M.; LIN, J.W.; CHERKSEY, B. (1989). Blocking and isolation of a calcium channel from neurons in mammals and cephalopods utilizing a toxin fraction (FTX) from funnel-web spider poison. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 1689-1693.
- LORD, J.A.H.; WATERFIELD, A.A.; HUGHES, J. y KOSTERLITZ, H.W. (1977). Endogenous opioid peptides: multiple agonists and receptors. *Nature* 267: 495-499.
- LUJAN, M.; LOPEZ, E.; RAMIREZ, R.; AGUILAR, H.; MARTINEZ-OLMEDO, M.A. y GARCIA-SAINZ, J.A. (1984). Pertussis toxin blocks the action of morphine, norepinephrine and clonidine on isolated guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 100: 377-380.
- LUJAN, M. y RODRIGUEZ, R. (1981). Pharmacological characterization of opiate physical dependence in the isolated ileum of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 73: 859-866.
- LUX, B. y SCHULZ, R. (1986). Effect of cholera toxin and pertussis toxin on opioid tolerance and dependence in the guinea-pig myenteric plexus. *J. Pharmacol.*

237: 995-1000.

- MADIERA, V.M. y ANTUNES-MADIERA, M.C. (1973). Interaction of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  with synaptic plasma membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 323: 396-407.
- MALFROY, B.; SWERTS, J.P.; GUYON, A.; ROQUES, B.P. y SCHWARTZ, J.C. (1978). High-affinity enkephalin-degrading peptidase in brain is increased after morphine. *Nature* 276: 523-526.
- MALTA, E; RAPER, C y TAWA, P.E. (1981). Pre- and postjunctional effects of clonidine and oxymetazoline-like compounds in guinea-pig ileal preparations. *Br. J. Pharmacol.* 73: 355-362.
- MANALLACK, D.T.; BEART, P.M. y GUNDLACH, A.L. (1986). Psychotomimetic  $\sigma$ -opiates and PCP. *Trends Pharmacol. Sci.* 7: 448-451.
- MANSOUR, A; KHACHATURIAN, H.; LEWIS, M.E.; AKIL, H. y WATSON, S.J. (1988). Anatomy of CNS opioid receptors. *Trends Neurosci.* 11: 308-314.
- MARANGOS, P.J.; PATEL, J.; MILLER, C. y MARTINO, A.M. (1982). Specific calcium antagonist binding sites in brain. *Life Sci.* 31: 1575-1585.
- MARSCH, J.D.; LOH, E.; LACHANCE, D.; BARRY, W.H. y SMITH, T.W. (1983). Relationship of binding of calcium channel blocker to inhibition of contraction in intact cultured embryonic chick ventricular cell. *Circ. Res.* 53: 539-543.
- MARTIN, M.I.; ALFARO, M.J.; DEL VAL, V. y COLADO, M.I. (1989). Tolerancia y síndrome de abstinencia en ileon de cobayos tratados con suspensión de morfina. Estudio comparativo. *Rev. Farmacol. Clin. Exp.* 6: 65-69.
- MARTIN, M.I.; COLADO, M.I.; DEL VAL y ALFARO, M.J. (1990). Dihydropyridines on guinea-pig ileum. *Gen. Pharmacol.* 21: 41-44.
- MARTIN, W.R. (1966). Assessment of the dependence producing potentiality of narcotic analgesic. En: UVNAS, B, (ed.) *International Encyclopedia of Pharmacology and Therapeutics*, Oxford, Pergamon Press, pp. 155-180.
- MARTIN, W.R. (1967). Opioid antagonists. *Pharmacol. Rev.* 19: 463-521.
- MARTIN, W.R. y EADES, C.G.E. (1964) Pharmacological studies of spinal cord adrenergic and cholinergic mechanisms and their relation to physical

- dependence on morphine. *Psychopharmacologia* 11: 195-223.
- MARTIN, W.R.; EADES, C.G.; THOMPSON, J.A.; HUPPLER, R.E. y GILBERT, P.E. (1976). The effects of morphine and nalorphine-like drugs in nondependent and morphine-dependent chronic spinal dog. *J. Pharmacol Exp. Ther.* 197: 517-532.
- MARTIN, R. y VOIGT, K.H. (1982). Leucine-enkephalin-like immunoreactivity in vasopresin terminals is enhanced by treatment with peptidases. *Life Sci.* 31: 1729-1732.
- MASUKAWA, L.M. y PRINCE, D.A. (1982). Enkephalin inhibition of inhibitory input to CA1 and CA3 pyramidal neurons in the hippocampus. *Brain Res.* 249: 271-280.
- MATSUI, H. y YAMAMOTO, C. (1984). Neuronal sensitivity to opiate and opioid peptides in the bed nucleus of the stria terminalis: effects of chronic treatment with morphine. *Neuropharmacology* 23: 755-762.
- MAYER, J.M.; KHANA, J.M.; KALANT, H. y SPERO, L. (1980). Cross-tolerance between ethanol and morphine in the guinea-pig ileum longitudinal-muscle/myenteric plexus preparation. *Eur. J. Pharmacol.* 63: 223-227.
- MCBURNEY, R.N. y NEERING, I.R. (1987). Neuronal calcium homeostasis. *Trends Neurosci.* 10: 164-169.
- McCLESKEY, Y.E.W.; FOX, A.P.; FELDMAN, D. y TSIEN, R.W. (1986). Different types of calcium channels. *J. Exp. Biol.* 124: 177-190.
- MCRAE-DEGUEURCE, A.; BEROD, A.; MERMET, A.; KELLER, A.; CHOUVET, G. y col. (1982). Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat *locus coeruleus*: Evidence for the involvement of serotonin afferents. *Brain Res.* 235: 285-301.
- MEYER, H.; SCHERLING, D. y KARL, W. (1983a). Nitrendipine: Identification and synthesis of main metabolites. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 33(I): 1528-1534.
- MEYER, H. y SPARBER, S.B. (1976). Clonidine antagonizes body weight loss and other symptoms used to measure withdrawal in morphine pelleted rats given naloxone. *Pharmacologist* 18: 236.
- MEYER, H.; WEHINGER, E.; BOSSERT, F.; SCHERLING, D. (1983b). Nisoldipine: synthesis and metabolic pathway. *Arzneim. Forsch. Drug Res.* 33(I): 106-112.

- MIDDLEMISS, D.N. y SPEDDING, M. (1985). A functional correlate for the dihydropyridine binding site in rat brain. *Nature* 314: 94-96.
- MILLER, R.J.; CHANG, K.J. y CUATRECASAS, P. (1977). The metabolic stability of the enkephalins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 74(4):1311-1317.
- MIYAKE, M.; CHRISTIE, M.J. y NORTH, R.A. (1989). Single potassium channels opened by opioids in rat *locus coeruleus* neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3419-3422.
- MOLEMAN, P. y BRUINVELS, J. (1976). Differential effect of morphine on dopaminergic neurons in frontal cortex and striatum of the rat. *Life Sci.* 19: 1277-1282.
- MOREL, N. y GODFRAIND, T. (1982).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in heart and smooth muscle microsomes. *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* 258: 319-321.
- MOREL, N. y GODFRAIND, T. (1984).  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange in smooth muscle microsomes. *Biochem. J.* 218: 421-427.
- MOREL, N.; WIBO, M. y GODFRAIND, T. (1981). A calmodulin-stimulated  $\text{Ca}^{2+}$  pump in rat aorta plasma membranes. *Biochem. Biophys. Acta* 644: 82-88.
- MORGAN, I.G. y AUSTIN, L. (1968). Synaptosomal protein synthesis in a cell-free system. *J. Neurochem.* 15: 41-51.
- MORGENROTH, V.H.; BOODLE-BICHER, M.C. y ROTH, R.H. (1975). Activation of tyrosine hydroxylase from central noradrenergic neurons by calcium. *Mol. Pharmacol.* 11: 427-435.
- MORGENROTH, V.H.; BOODLE-BICHER, M.C. y ROTH, R.H. (1976). Dopaminergic neurons: Activation of tyrosine hydroxylase by a calcium chelator. *Mol. Pharmacol.* 12: 41-48.
- MORITA, K. y NORTH, R.A. (1982). Opiate activation of potassium conductance in myenteric neurons: inhibition by calcium ion. *Brain Res.* 242: 145-150.
- MORONI, F.; CHENEY, D.L.; PERALTA, E. y COSTA, E. (1978). Opiate receptor agonists as modulators of gamma-aminobutyric acid turnover in the nucleus caudatus, globus pallidus and substantia nigra of the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 207: 870-877.

- MOSBERG, H.I.; HURST, R.; HRUBY, V.J.; GEE, K.; YAMAMURA, H.I.; GALLIGAN, J.J. y BURKS, T.F. (1983). Bis-penicillamine enkephalins possess highly improved specificity toward  $\delta$  opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 80: 5871-5874.
- MOUDY, A.M.; SPAIN, J.W. y COSCIA, C.J. (1985). Differential up-regulation of microsomal and synaptic membrane *mu* opioid receptors. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132: 735-741.
- MULE, S.J.; CASELA, G. y CLOUET, D.H. (1974). Localization of narcotic analgesics in synaptic membranes of rat brain. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 9: 55-77.
- MUNRO, A.F. (1953) Effect of autonomic drugs on the responses of isolated preparations from the guinea-pig intestine to electrical stimulation. *J. Physiol.* 120: 41-52.
- MURAKI, T.; TOKUNAGA, Y.; MAKADATE, T. y KATO, R. (1981). Increased in plasma cyclic AMP levels elicited by naloxone in morphine-dependent male mice. *Neuropharmacol.* 20: 177-181.
- MURPHY, K.H.M.; GOULD, R.J. y SNYDER, S.H. (1982). Autoradiographic visualization of [ $^3$ H]nitrendipine binding sites in rat brain: localization to synaptic zones. *Eur. J. Pharmacol.* 81: 517-519.
- NAKAKI, T.; MURAKI, T.; TOKUNAGA, Y. y KATO, R. (1981). Plasma cyclic AMP in the morphine-tolerant rat. *Biochem. Pharmacol.* 30: 2217-2220.
- NAYLER, W.G. y POOLE-WILSON, P. (1981). Calcium antagonists. Definition and mode of action. *Basic Res. Cardiol.* 76: 1-15.
- NEHER, E. (1988). The use of the patch clamp technique to study second messenger-mediated cellular events. *Neuroscience* 26: 727-734.
- NICOLL, R.A (1982). Responses of central neurones to opiates and opioid peptides. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 33: 337-346.
- NICOLL, R.A. (1988). The coupling of neurotransmitter receptors to ion channels in the brain. *Science* 241: 545-550.
- NILIUS, B., HESS, P.; LANSMAN, J.B. y TSIEN, R.W. (1985). A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells. *Nature* 316: 443-446.

- NORTH, R.A. (1979). Opiates, opioid peptides and single neurones. *Life Sci.* 24: 1527-1546.
- NORTH, R.A.; KATAYAMA, Y. y WILLIAMS, J.T. (1979). On the mechanism and site of action of enkephalin on single myenteric neurons. *Brain Res.* 165: 67-77.
- NORTH, R.A. y TONINI, M. (1977). The mechanism of action of narcotic analgesics in the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 61: 541-549.
- NORTH, R.A. y WILLIAMS, J.T. (1977). Extracellular recording from the guinea-pig myenteric plexus and the action of morphine. *European. J. Pharmacol.* 45: 23-33.
- NORTH, R.A.; WILLIAMS, J.T.; SUPRENANT, A. y CHRISTIE, M.J. (1987). *Mu* and *delta* receptors belong to a family of receptors that are coupled to potassium channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 5487-5491.
- NOWYCKY, M.C.; FOX, A.P. y TSIEN, R.W. (1985). Three types of neuronal calcium channel with different calcium agonist sensitivity. *Nature* 316: 440-443.
- OISHI, R.; OZAKI, M. y TAKEMORI, A.E. (1983). *In vivo* binding of naloxone to opioid receptors in morphine-dependent mice. *Neuropharmacology* 22: 1015-1019.
- OKA, T.; NEGISHI, K.; SUDA, M.; SAWA, A.; FUJIMOTO, M. y WAKIMASU, M. (1982). Evidence that dynorphin (1-13) acts as an agonist on opioid *kappa* receptor. *Eur. J. Pharmacol.* 73: 137-141.
- OLSON, K.G. y WELCH, S.P. (1991). The effects of dynorphin A(1-13) and U50,488H on free intracellular calcium in guinea pig cerebellar synaptosomes. *Life Sci.* 48: 575-581.
- ONALI, P. y OLIVANAS, M.C. (1991). Naturally occurring opioid receptor agonists stimulate adenylate cyclase activity in rat olfactory bulb. *Mol. Pharmacol.* 39: 436-441.
- OPIE, L. (1989). Calcium channel antagonist. Part IV: Clinical pharmacokinetics of first and second-generation agents. *Cardiovasc. Drugs Ther.* 3: 482-497.
- OPMEER, F.A. y VAN REE, J.M. (1978). Induction of morphine tolerance in isolated guinea pig ileum. En: VAN REE, J.M. y TERENIUS, L. (eds.). *Characteristics and Function of Opioids*, Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam, pp. 63-64.



- ORAHOVATS, P.D.; WINTER, C.A. y LEHMAN, E.G. (1953). The effect of N-allylnormorphine upon the development of tolerance to morphine in the albino rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 109: 413-416.
- PALMER, M.R.; MORRIS, D.H. TAYLOR, D.A.; STEWART, J.M. y HOFFER, B.J. (1978). Electrophysiological effects of enkephalin analogs in rats cortex. *Life Sci.* 23: 851-860.
- PAOLETTI, R. y GOVONI, S. (1987). Classification of calcium antagonist: Proposal of the WHO committee. *Pharmacol. Res. Comm.* 19: 195-208.
- PASTERNAK, G.W. y WOOD, P.J. (1986). Minireview: multiple opiate receptors. *Life Sci.* 38: 1889-1898.
- PASTERNAK, G.W.; SNOWMAN, A.M. y SNYDER, S.H. (1975). Selective enhancement of 3H opiate agonist binding by divalent actions. *Mol. Pharmacol.* 11: 735-744.
- PATON, W.D.M. (1957). The action of morphine and related substances on contraction and on acetylcholine output of coaxially stimulated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 11: 119-127.
- PATON, W.D.M. y ZAR, M.A. (1968). The origin of acetylcholine released from guinea-pig intestine and longitudinal strips. *J. Physiol.* 194: 13-33.
- PELLEGRINI-GIAMPIETRO, D.E.; BACCIOTTINI, L.; CARLA, V. y MORONI, F. (1988). Morphine withdrawal in cortical slices: suppression by Ca<sup>2+</sup>-channel inhibitors of abstinence-induced [<sup>3</sup>H]-noradrenaline. *Br. J. Pharmacol.* 93: 535-540.
- PEPPER, C.M. y HENDERSON, G. (1980). Opiates and opioid peptides hyperpolarize locus coeruleus neurons in vitro. *Science* 209: 394-395.
- PERRY, D.C.; ROSENBAUM, J.S. y SADEE, W. (1982). In vivo binding of <sup>3</sup>H-etorphine in morphine-dependent rats. *Life Sci.* 31: 1405-1408.
- PERSSON, S.A. (1979). Effect of morphine on the accumulation of dopa after decarboxylase inhibition in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 55: 121-128.
- PERT, C.B. y SNYDER, S.H. (1973a). Opiate receptors: its demonstration in nervous tissue. *Science* 179: 1011-1014.
- PERT, C.B. y SNYDER, S.H. (1973b). Properties of opiate receptor binding in rat brain.

*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 2243-2247.

- PERT, C.B. y SNYDER, S.H. (1974). Opiate receptor binding of agonists and antagonists affected differentially by sodium. *Mol. Pharm.* 10: 868-879.
- PERKINS, M.N. y STONE, T.W. (1980). Blockade of striatal neurone responses to morphine byaminophylline: evidence for adenosine mediation of opiate action. *Br. J. Pharmacol.* 69: 131-137.
- PHILLIS, J.W. (1974). The role of calcium in the central effects of biogenic amines. *Life Sci.* 14: 1189-2101.
- PICKEL, V.M.; JOH, T.H. y REIS, D.J. (1977). A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus locus ceruleus: Demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res.* 131: 197-214.
- PILEBLAD, E. y CARLSSON, A. (1987). The  $Ca^{++}$ -agonist nimodipine decreases and the  $Ca^{++}$ -agonist BAY K8644 increases catecholamine synthesis in mouse brain. *Neuropharmacology* 26: 101-105.
- PINSKY, C.; DUA, A.K. y LABELLA, F.S. (1982). Peptidase inhibitors reduce opiate narcotic withdrawal signs, including seizure activity, in the rat. *Brain Res.* 243:301-307.
- PLOTTER, Y. y ATLAS, D. (1983). Characterization of benextramine as an irreversible alfa-adrenergic blocker of potassium activated calcium channels. *Eur. J. Biochem.* 133: 539-544.
- PORRECA, F. y BURKS, T.F. (1983). Affinity of normorphine for its pharmacologic receptor in the naive and morphine-tolerant guinea-pig isolated ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225: 688-693.
- PUTTFARCKEN, P.S.; WERLING, L.L. y COX, B.M. (1988). Effects of chronic morphine exposure on opioid inhibition of adenylate cyclase in 7315c cell membranes: a useful model for the study of tolerance at opioid receptors. *Mol. Pharmacol.* 33: 520-527.
- RAMKUMAR, V. y EL-FAKAHANY, E.E. (1984). Increase in  $^3H$ -nitrendipine binding site in the brain in morphine-tolerant mice. *Eur. J. Pharmacol.* 102: 371-372.

- RAMKUMAR, V. y EL-FAKAHANY, E.E. (1988). Prolonged morphine treatment increases rat brain dihydropyridine binding site: possible involvement in development of morphine dependence. *Eur. J. Pharmacol.* 146: 73-83.
- RÄMSCH, K.D.; GRAEFE, K.H.; SCHERLING, D.; SOMMER, J. y ZIEGLER, R. (1986). Pharmacokinetics and metabolism of calcium-bloking agents nifedipine, nitrendipine and nimodipine. *Am. J. Nephrol.* 6(supl. 1): 73-80.
- RASMUSSEN, H. (1970). Cell comunication, calcium ion, and cyclic adenosine monophosphate. *Science* 170: 404-412.
- RASMUSSEN, H.; GOODMAN, D.B.P. y TENNENHOUSE, A. (1972). The role of cyclic AMP and calcium in cell activation. *CRC Critical Rev in Biochem.* 1: 95-148.
- RATZ, P.H. y FLAIM, S.F. (1985). Acetylcholine and 5- hydroxytryptamine stimulated contraction and calcium uptake in bovine coronary artery evidence of two populations of receptor-operated calcium channels. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 641-647.
- REDMOND, D.E. Jr. (1981). Clonidine and the primate *locus coeruleus*: Evidence suggesting anxiolytic and anti-withdrawal effects. En: LAL, H. y FIELDING, S. (eds.) *Psychopharmacology of Clonidine*, New York, Liss, pp. 147-173.
- REDMOND, D.E. Jr.; GOLD, M.D. y HUANG, Y.H. (1978). Enkephalin acts to inhibit *locus coeruleus* mediated behaviors. *Neurosci. Abstr.* 4: 413(1306).
- REDMOND, D.E. Jr. y HUANG, Y.H. (1979). Current concepts II. New evidence for a *locus coeruleus* morepinephrine connection with anxiety. *Life Sci.* 25: 2149-2162.
- REDMOND, D.E. Jr.; HUANG, Y.H.; SNYDER, D.R.; MAAS, J.W. (1976). Behavioral effects of stimulation of the nucleus *locus coeruleus* in the stump-tailed monkey (*Macaca arctoides*). *Brain Res.* 116: 502-510.
- REDMOND, D.E. Jr. y KRISTAL, J.H. (1984). Multiple mechanisms of withdrawal from opioid drugs. *Ann. Rev. Neurosci.* 7: 443-478.
- REIMANN, W.; KOELLHOFER, U. (1988). Voltage-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  channels in rat brain neocortical noradrenergic nerve terminals. Different sensitivity to inorganic and organic  $\text{Ca}^{2+}$  channel antagonists. *Pharmacology* 36: 249-257.
- REIS, D.J.; HESS, P. y AZMITIA, E.C. (1970). Changes in enzymes subserving

- catecholamine metabolism in morphine tolerance and withdrawal in rat. *Brain Res.* 20: 309-315.
- REUTER, H. (1973). Divalent cations as charge carriers in excitable membranes. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 26: 1-43.
- REZVANI, A.; HUIDROBRO-TORO, J.P.; HU, J. y WAY, E.L. (1983). A rapid and simple method for the quantitative determination of tolerance development to opiates in the guinea-pig ileum in vitro. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 225: 251-255.
- ROBINSON, J.H.; DUNLAP, C.E. y DEADWYLER, S.A. (1982). Differences in opiate-induced synaptic excitability of hippocampal slices prepared from tolerant and nontolerant rats. *Exp. Neurol.* 77: 590-598.
- RODBELL, M. (1980). The role of hormone receptors and GTP-regulatory proteins in membrane transduction. *Nature* 284: 17-22.
- ROGERS, N.F. y EL-FAKAHANY, E. (1986). Morphine-induced opioid receptor down-regulation detected in intact adult rat brain cells. *Eur. J. Pharmacol.* 124: 221-230.
- ROMANDINI, S.; CERVO, L. y SAMANIN, R. (1984). Evidence that the drugs increasing 5-hydroxytryptamine transmission block jumping but not wet dog shakes in morphine abstinent rats: a comparison with clonidine. *J. Pharm. Pharmacol.* 36: 68-70.
- ROQUES, B.P.; FOURNIE-ZALUSKI, M.C.; SOROCA, E.; LECOMTE, J.M.; Malfroy, B. y col. (1980). The enkephalinase inhibitor thiorphan shows antinociceptive activity in mice. *Nature* 288: 286-288.
- ROSS, D.H. (1975). Tolerance to morphine induced calcium depletion. *Br. J. Pharmacol.* 55: 4312-437.
- ROSS, D.H. y LYNN, S.C. (1975). Characterization of acute tolerance to morphine using reserpine and cycloheximide. *Biochem. Pharmacol.* 24: 447-450.
- ROSS, D.H.; LYNN, S.C. y CARDENAS, H.L. (1976). Selective control of calcium levels by naxolone. *Life Sci.* 18: 789-796.
- ROSS, D.H.; LYNN, S.C. y CARDENAS, H.L. (1977). Ions, opiates and cellular adaptation, En: *Alcohol and Opiates*, New York, Academic Press, pp. 265-281.

- ROSS, D.H.; MEDINA, M.A. y CARDENAS, H.L. (1974). Morphine and ethanol: Selective depletion off regional brain calcium. *Science* 186: 63-65.
- ROTH, R.H.; ELSWORTH, J.D. y REDMOND, D.E. Jr. (1982). Clonidine suppression of noradrenergic hyperactivity during morphine withdrawal by clonidine: Biochemical studies in rhesus and primates. *J. Clin. Psychiat.* 43(6):[sec.2] 42-46.
- RUBINI, P.; SCHULZ, R.; WÜSTER, M. y HERZ, A. (1982). Opiate receptor binding studies in the mouse vas deferens exhibiting tolerance without dependence. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 319: 142-146.
- RUFF, R.L. (1986). Ionic channels II: Voltage and agonist gated and agonist modified channel properties and structure. *Muscle & Nerve* 9: 767-786.
- SALTO, C.; CALVET, R. Y GUITART, X. (1990). Opiates depress ACh and ATP release from cholinergic synaptosomes by blocking calcium uptake. *Toxicol Appl. Pharmacol.* 106: 20-27.
- SANGUINETTI, M.C. y KASS, R.S. (1984). Voltage-dependent block of calcium channel current in the calf cardiac Purkinje fiber by dihydropyridine calcium channel antagonists. *Circ. Res.* 55: 336-348.
- SASA, M.; MUNEKIYO, K.; TAKAORI, S. (1975). Morphine interference with noradrenaline mediated inhibition from the *locus coeruleus*. *Life Sci.* 17: 1373-1380.
- SATO, T.; TAKAYANAGI, I. y TAKAGI, K. (1973). Pharmacological properties of electrical activities obtained from neurones in Auerbach's plexus. *Jpn. J. Pharmacol.* 23: 665-671.
- SATOH, M.; ZIEGLGÄNSBERGER, W.; FRIES, W. y HERZ, A. (1974). Opiate agonist-antagonist interaction at cortical neurones of naive and tolerant/dependent rats. *Brain Res.* 82: 378-382.
- SATOH, M.; ZIEGLGÄNSBERGER, W. y HERZ, A. (1975). Interaction between morphine and putative excitatory neurotransmitters in cortical neurones in naive and tolerant rats. *Life Sci.* 17: 75-80.
- SATOH, M.; ZIEGLGÄNSBERGER, W. y HERZ, A. (1976a). Actions of opiates upon single unit activity in the cortex of naive and tolerant rats. *Brain Res.* 115: 99-110.
- SATOH, M.; ZIEGLGÄNSBERGER, W. y HERZ, A. (1976b). Supersensitivity of cortical

- neurones of the rat to acetylcholine and l-glutamate following chronic morphine treatment. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 293: 101-103.
- SAWYNOK, J. y JHAMANDAS, K.H. (1976). Inhibition of acetylcholine release from cholinergic nerves by adenosin, adenine nucleotides and morphine: antagonism by theophylline. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 197: 379-390.
- SAWYNOK, J. y JHAMANDAS, K.H. (1979). Interactions of methylxanthines, nonxantine phosphodiesterase inhibitors, and calcium with morphine in the guinea pig myenteric plexus. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 57: 853-859.
- SCHAUMANN, W. (1955). The paralysing action of morphine on the guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 10: 456-461.
- SCHAUMANN, W. (1957). Inhibition by morphine of the release of acetylcholine from the intestine of the guinea-pig. *Br. J. Pharmacol.* 12: 115-118.
- SCHERLING, D.; AHR, G. y KARL, W. (1987). Biotransformation of nisoldipine in man. En: HUGENHOLTZ, P.G. y MEYER, J. (eds.) *Nisoldipine 1987*, Berlin, Springer-Verlag, pp. 85-88.
- SCHROEDER, J.E.; FISCHBACH, P.S.; ZENG, D. y McCLESKEY, E.W. (1991). Activation of  $\mu$  opioid receptors inhibits transient high- and low-threshold  $\text{Ca}^{2+}$  currents, but spares a sustained current. *Neuron* 6: 15-20.
- SCHWARTZ, J.C.; POLLARD, H.; LLORENS, C.; Malfroy, B.; GROS, C. y col. (1978). Endorphins and endorphin receptors in striatum: Relationships with dopaminergic neurons. *Adv. Biochem. Psychopharmacol.* 18: 245-264.
- SHARKAWI, M. (1972). Morphine hyperthermia in the rat: Its attenuation by physostigmine. *Br. J. Pharmacol.* 44: 544-548.
- SHEARMAN, M.S.; SEKIGUCHI, K. y NISHIZUKA, J. (1989). Modulation of ion channel activity: A key function of the protein kinase C enzyme family, *Pharmacol. Rev.* 41: 211-237.
- SCHILD, H.O. (1947). pA, a new scale for the measurement of drug antagonism. *Br. J. Pharmacol. Chemother.* 2: 189-206.
- SCHOEMAKER, M. y LANGER, S.Z. (1985).  $^3\text{H}$ -diltiazem binding to calcium channel antagonists recognition sites in rat cerebral cortex. *Eur. J. Pharmacol.* 111: 273-

277.

- SCHOEMAKER, M.; LEE, H.R.; ROESKE, W.R. y YAMAMURA, H.I. (1983). *In vivo* identification of calcium antagonist binding sites using [ $^3\text{H}$ ]-nitrendipine. *Eur. J. Pharmacol.* 88: 275-276.
- SCHRAMM, M. y SELINGER, Z. (1984). Message trnasmission: receptor controlled adenylate cyclase system. *Science* 225: 1350-1356.
- SCHULZ, R. y CARTWRIGHT, C. (1974). Effect of morphine on setotonin release from myenteric plexus of the guinea pig. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 190: 420-430.
- SCHULZ, R.; CARTWRIGHT, C. y GOLDSTEIN, A. (1974). Reversibility of morphine tolerance and dependence in guinea pig brain and myenteric plexus. *Nature* 251: 329-331.
- SCHULZ, R.; FAASE, E.; WÜSTER, M. y HERZ, A. (1979). Selective receptors for beta-endorphin on the rat vas deferens. *Life Sci.* 24: 843-850.
- SCHULZ, R. y HERZ, A. (1976). Aspects of opiate dependence in the myenteric plexus of the guinea-pig. *Life Sci.* 19: 1117-1128.
- SCHULZ, R.; SEIDL, E. y HERZ, A. (1985). Opioid dependence in the guinea-pig myenteric plexus is controlled by non-tolerant and tolerant opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 110: 335-341.
- SCHULZ, R.; SEIDL, E.; WÜSTER, M. y HERZ, A. (1982). Opioid dependence and cross-dependence in the isolated guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 84: 33-40.
- SEEMAN, P. (1972). The membrane actions of anesthetics and tanquilizers. *Pharmacol. Rev.* 24: 583-655.
- SEGAL, M. (1979). Serotonergic innervation of the *locus coeruleus* from the dorsal raphe and its action on responses to noxious stimuli. *J. Physiol.* 286:401-415.
- SHANI,J.; AZOV,R. y WEISSMAN, B.A. (1979). Enkephalin levels of morphine administration. *Neurosci. Lett.* 12: 319-322.
- SHARMA, S.K.; NIRENBERG, M. y KLEE, W.A. (1975a). Morphine receptors as regulators of adenylate cyclase activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 590-594.

- SHARMA, S.K.; KLEE, W.A. y NIRENBERG, M. (1975b). Dual regulation of adenylate cyclase accounts for narcotic dependence and tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 72: 3092-3096.
- SHARMA, S.K.; KLEE, W.A. y NIRENBERG, M. (1977). Opiate-dependent modulation of adenylate cyclase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74: 3365-3369.
- SHEARMAN, M.S.; SEKIGUCHI, K. y NISHIZUKA, J. (1989). Modulation of ion channel activity: A key function of the protein kinase C enzyme family. *Pharmacol. Rev.* 41: 211-237.
- SHIBATA, S. y CARRIER, O. (1967). Antagonizing action of chlorpromazine, dibenamine and phenoxybenzamine on potassium-induced contraction. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 45: 587-596.
- SHIBATA, S.; CARRIER, O. y FRANKENHEIM, J. (1968). Effects of chlorpromazine, dibenamine and phenoxybenzamine on the contractile response of *taenia coli* to potassium, acetylcholine, angiotensin and barium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 160: 106-111.
- SHIKIMI, T.; KANETO, H. y KANO, K. (1967). Effect of morphine on the liberation of acetylcholine from the mouse cerebral cortical slices in relation to the calcium concentration in the medium. *Jpn. J. Pharmacol.* 17: 136-137.
- SHIKIMI, T.; KANETO, H. y KANO, K. (1971). En: CLOUET, D.H. (ed.) *Narcotic drugs: Biochemical Pharmacology*, New York, Plenum Press, pp.301.
- SHOHAM, S. y WEINSTOCK, M. (1974). The role of supersensitivity to acetylcholine in the production of tolerance to morphine in stimulated guinea-pig ileum. *Br. J. Pharmacol.* 52: 597-603.
- SIBLEY, D.R. y LEFKOWITZ, R.J. (1985). Molecular mechanisms of receptor desensitization using the  $\beta$ -adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature* 317: 124-129.
- SIEGEL, R.K. (1978). Phencyclidine and ketamine intoxication: A study of four populations of recreational users. En: PETERSEN, R.C. y STILLMAN, R.C. (eds.) *PCP Phencyclidine abuse. An appraisal*. Institute on Drug Abuse. Department of Health, Education and Welfare. Publication No (ADM) 78-728. Washington, Printing Office, pp. 119-147.



- SIEKEVITZ, P.; CARLIN, R. y WU, K. (1985). Existence of a voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channel protein in synaptic membrane (SM) and postsynaptic density (PSD) fractions isolated from cerebral cortex and cerebellum (CC) of canine brain as determined by nitrendipine binding. *Soc. Neurosci. Abstr.* 11: 646.
- SIMANTOV, R. y SNYDER, F.H. (1976). Elevated levels of enkephalin in morphine-dependent rats. *Nature* 262: 505-507.
- SIMMONS, W.H. y RITZMANN, R.F. (1980). An inhibitor of opioid peptide degradation produces analgesia in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13(5):715-718.
- SIMON, E.J.; HILLER, J.M. y EDELMAN, I. (1973). Stereospecific binding of the potent narcotic analgesic 3H etorphine to rat-brain homogenate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1947-1949.
- SIMON, E.J.; HILLER, J.M.; GROTH, J. y EDELMAN, I. (1975). Further properties of stereospecific opiate binding sites in rat brain: On the nature of the sodium effect. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 192: 531-537.
- SIVAM, S.P.; NABESHIMA, T. y HO, I.K. (1981). Alterations of synaptic high and low affinity opiate binding sites after acute and chronic morphine administration in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* 6: 119-127.
- SIVAM, S.P.; NABESHIMA, T. y HO, I.K. (1982). An analysis of GABA receptor changes in the discrete regions of mouse brain after acute and chronic treatments with morphine. *J. Neurochem.* 39: 933-939.
- SMITH, C.B.; HOLLINGSWORTH, P.J.; GEER, J.J. y MOISES, H.C. (1983). Changes in  $\alpha_2$  adrenoceptors in various areas of the rat brain after long-term administration of *mu* and *kappa* opiate agonists *Life Sci.* 33(supp. 1): 369.
- SMITH, C.B.; MOISES, H.C.; SPENGLER, R.N. y HOLLINGSWORTH, P.J. (1989). Changes in  $\alpha_2$ -adrenoceptor number and function in brains of morphine-dependent rats. *Eur. J. Pharmacol.* 161: 111-119.
- SMITH, C.B.; SHELDON, M.I.; BEDNARCZYK, J.H. y VILLAREAL, J.E. (1972). Morphine induced increases in the incorporation of  $^{14}\text{C}$ -tyrosine into  $^{14}\text{C}$ -dopamine and  $^{14}\text{C}$ -norepinephrine in the mouse brain: Antagonism by naloxone and tolerance. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 180: 547-557.
- SOMLYO, A.V. y SOMLYO, A.P. (1968). Vascular smooth muscle I. Normal structure,

pathology, biochemistry and biophysics. *Pharmacol. Rev.* 20: 197-272.

- SPEDDING, M. (1982). Assessment of "Ca<sup>++</sup>-antagonistic" effect of drugs in K<sup>+</sup> depolarized smooth muscle. Differentiation of antagonistic subgroups. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 318: 234-240.
- SPEDDING, M. (1985). Calcium antagonist subgroups. *Trends Pharmac. Sci.* 6: 109-114.
- SPEDDING, M. (1987). Three types of Ca<sup>++</sup> channels explain discrepancies. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 115-117.
- SPEDDING, M. y CAVERO, I. (1984). Calcium antagonists: A class of drugs with a bright future. Determination of basic pharmacological properties. *Life Sci.* 35: 575-587.
- STANDFIELD, P.R. (1986). Voltage-dependent calcium channels of excitable membranes. *Br. Med. Bull.* 42: 359-367.
- STEECE, K.A.; DE LEON-JONES, F.A.; MEYERSON, L.R.; LEE, J.M.; FIELDS, J.Z. y RITZMANN, R.F. (1986). *In vivo* down-regulation of rat striatal opioid receptors by chronic enkephaline. *Brain Res. Bull.* 17: 255-257.
- STEPHENSON, R.P. (1956). A modification of receptor theory. *Br. J. Pharmacol.* 11: 379-393.
- STRIESSNIG, J.; ZERNIG, G. y GLOSSMANN, H. (1985a). Human red-blood cell Ca<sup>++</sup>-antagonist binding sites. Evidence for an unusual receptor coupled to the nucleoside transporter. *Eur.J. Biochem.* 150: 67-77.
- STRIESSNIG, J.; ZERNIG, G. y GLOSSMANN, H. (1985b). Ca<sup>++</sup> antagonist receptor sites on human red-blood cell membranes. *Eur. J. Pharmacol.* 108: 329-330.
- SU, Y.-F.; CUBBEDU-XIMENEZ, L. y PERKINS, J.P. (1976a). Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate content of human astrocytoma cells: desensitization to catecholamines and prostaglandins. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 2: 257-270.
- SU, Y.-F.; JOHNSON, G.L.; CUBEDDU-XIMENEZ, L.; LEICHTLING, B.H.; ORTMANN, R. y PERKINS, J.P. (1976b). Regulation of adenosine 3',5'-monophosphate content of human astrocytoma cells: mechanism of agonist specific desensitization. *J. Cyclic Nucleotide Res.* 2: 271-285.
- SUPRENANT, A. y NORTH, R.A. (1985).  $\mu$ -opioid receptors and  $\alpha_2$ -adrenoceptors

- coexist on myenteric but not on submucous neurones. *Neurosci.* 16: 425-430.
- SUTOR, B. y ZIEGLGÄNSBERGER, W. (1984). Actions of D-Ala<sup>2</sup>-D-Leu<sup>6</sup>-enkephalin and dynorphin A(1-17) on neocortical neurons *in vitro*. *Neuropeptides* 5: 241-244.
- SVENSSON, L. y AHLENIUS, S. (1982). Funcional importance of nucleus accumbens noradrenaline in the rat. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 50: 22-24.
- SVENSSON, T.H.; BUNNEY, B.S. y AGHAJANIAN, G.K. (1975). Inhibition of both noradrenergic and serotonergic neurons in brain by the alpha-adrenergic agonist clonidine. *Brain Res.* 92:291-306.
- SWANN, A.C.; ELSWORTH, J.D.; CHERNEY, D.S.; JABLONS, D.M.; ROTH, R.H.; REDOMOND, D.E. Jr. y MAAS, J.W. (1983). Brain catecholamine metabolites and behaviour in morphine withdrawal. *Eur. J. Pharmacol.* 86: 167.
- SWANSON, L.W. y HARTMAN, B.K. (1975). The central adrenergic system: an immunofluorescence study of the location of cell bodies and their efferent connexions in the rat utilizing dopamine-beta-hydroxylase as a marker. *J. Comp. Neurol.* 163: 467-506.
- SWANSON, T.H. y GREEN, C.L. (1986). Nifedipine more than a calcium channel blocker. *Gen. Pharmacol.* 17: 255-260.
- SWENSSON, L.; BUNNEY, B.S. y AGHAJANIAN, F.K. (1975). Inhibition of both noradrenergic and setotnergic neurons in brain by the alpha adrenergic agonist clonidine. *Brain Res* 92: 291-306.
- TAKEMORI, A.E.; OKA, T. y NISHIYAMA, N. (1973). Alteration of analgesic receptor-antagonist interaction induced by morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 186: 261-265.
- TAMARGO, J. y VALENZUELA, C. (1987). Fármacos antiaritmicos. En: *Farmacología y su proyección a la clínica*, 15 ed., Madrid, Oteo, pp. 465-480.
- TAO, P.L.; LAW, P.Y. y LOH, H.H. (1987). Decrease in *delta* and *mu* opioid receptor binding capacity in rat brain after chronic etorphine treatment. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 240: 809-816.

- TAYLOR, D.A.; LEEDHAM, J.A.; DOAK, N. y FLEMING, W.W. (1988a). Morphine tolerance and nonspecific subsensitivity of the longitudinal muscle myenteric plexus preparation of the guinea-pig to inhibitory agonists. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 338: 553-559.
- TAYLOR, J.R.; ELSWORTH, J.D.; GARCIA, E.J.; GRANT, S.J.; ROTH, R.H. y REDMOND, D.E. Jr. (1988b). Clonidine infusions into the *locus coeruleus* attenuate behavioral and neurochemical changes associated with naloxone-precipitated withdrawal. *Psychopharmacology* 96: 121-134.
- TEMPEL, A.; GARDNER, E.L. y ZUKIN, R.S. (1985). Neurochemical and functional correlates of naltrexone-induced opiate receptor up-regulation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 439-444.
- TEMPEL, A.; CRAIN, S.M.; PETERSON, E.R.; SIMON, E.J. y ZUKIN, E.S. (1986). Antagonist-induced opiate receptor upregulation in cultures of fetal mouse spinal cord-ganglion explants. *Brain Res.* 390: 287-291.
- TERENIUS, L. (1973). Stereospecific interaction between narcotic analgesics and a synaptic plasma membrane fraction of rat cerebral cortex. *Acta. Pharmacol. Toxicol.* 32: 317-320.
- TIBERI, M. y MAGNAN, J. (1990). Demonstration of the heterogeneity of the K-opioid receptor in guinea-pig cerebellum using selective and nonselective drugs. *Eur. J. Pharmacol. Mol. Pharmacol.* 188: 379-389.
- TORPHY, T.J.; WESTFALL, D.P. y FLEMING, W.W. (1982). Effect of reserpine pretreatment on mechanical responsiveness and [<sup>125</sup>I]-iodohydroxybenzylpindolol binding sites in the guinea-pig right atrium. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 223: 332-341.
- TRAUTWEIN, W. y CAVALIE, A. (1985). Cardiac calcium channels and their control by neurotransmitter and drugs. *J. Am. Coll. Cardiol.* 6: 1409-1416.
- TRENDELENBURG, P. (1917). Physiologische und pharmacologische Versuche uber die Dunndarmperistaltik. *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 81: 55-129.
- TRENDELENBURG, U. (1963). Supersensitivity and subsensitivity to sympathomimetic amines. *Pharmacol Rev.* 15: 225-276.
- TRENDELENBURG, U. (1986). The metabolizing systems involves in the inactivaion of

catecholamines. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 332: 201-207.

- TRIGGLE, C.R.; AGRAWAL, D.K.; BOLGER, G.T.; DANIEL, E.E.; KWAN, C.Y.; LUCHOWSKI, E.M. y TRIGGLE, D.J. (1982). Calcium-channel antagonist binding to isolated vascular smooth muscle membranes. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 60: 1738-1741.
- TRIGGLE, D.J. (1971). *Neurotransmitter-receptor interactions*, N.Y., Londres, Academic Press.
- TRIGGLE, D.J. (1972). Effects of calcium on excitable membranes and neurotransmitter action. *Prog. Surf. Mem. Sci.* 5: 267-331.
- TRIGGLE, D.J. (1988). Canales de  $Ca^{++}$  y receptores 1,4-dihidropiridina. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 9(suppl. 4): s5-s11.
- TRIGGLE, D.J. (1990). Calcium, calcium channels and calcium antagonist. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 68: 1474-1481.
- TRIGGLE, D.J. y JANIS, R.A. (1984). The 1,4-dihydropyridine receptor: a regulatory component of the calcium channel. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 6: s949-s955.
- TRIGGLE, D.J. y SWAMY, V.C. (1983). Calcium antagonists: Some chemical-pharmacological aspects. *Cir. Res.* 52: 17-28.
- TSENG, L.; LOH, H.H. y WEI, E.T. (1975). Effects of clonidine on morphine withdrawal signs in the rat. *Eur. J. Pharmacol.* 30: 93-99.
- TSIEN, R.W. y TSIEN, R.Y. (1990). Calcium channels, stress and oscillations. *Annu. Rev. Cell. Biol.* 6: 715-760.
- TSOU, K.; LOUIE, G. y WAY, E.L. (1982). Manifestations of gut opiate withdrawal contracture and its blockade by capsaicin. *Eur. J. Pharmacol.* 81: 377-383.
- TSOU, K.; WU, S.X.; LU, Y.A. y WAY, E.L. (1985). Block of the hyoscine-resistant opiate withdrawal contracture of ileum by a new substance P antagonist: D-Arg<sup>1</sup>, D-Phe<sup>5</sup>, D-Trp<sup>7,9</sup>, Leu<sup>11</sup>, substance P. *Eur. J. Pharmacol.* 110: 155-156.
- TUCKER, J.F. (1984). Effect of pertussis toxin on normorphine-dependence and on the acute inhibitory effects of normorphine and clonidine in guinea-pig isolated ileum. *Br. J. Pharmacol.* 83: 326-328.

- TULANAY, F.C. y TAKEMORI, A.E. (1974a). The increased efficacy of narcotic antagonists induced by various narcotic analgesics. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 190: 395-400.
- UCHIDA, S.; TAKEYASU, K.; MATSUDA, T. y YOSHIDA, H. (1979). Changes in muscarnic acetylcholine receptors of mice by chronic administration of diisopropylfluorophosphate and papaverine. *Life Sci.* 24: 1805-1812.
- UI, M. (1984). Islet-activating protein, pertussis toxin: a probe for functions of the inhibitory guanine nucleotide regulatory component of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol. Sci.* 5: 277-279.
- VACHON, L.; COSTA, T. y HERZ, A. (1985). Desensitization of opioid-stimulated GTPase in neuroblastoma x glioma hybrid cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 128: 1342-1349.
- VACHON, L.; COSTA, T. y HERZ, A. (1987a). Opioid receptor desensitization in NG108-15 cells: differential effects of a full and a partial agonist on opioid-dependent GTPase. *Biochem. Pharmacol.* 36: 2889-2897.
- VACHON, L.; COSTA, T. y HERZ, A. (1987b). GTPase and adenylate cyclase desensitize at different rates in NG108-15 cells. *Mol. Pharmacol.* 31: 159-168.
- VAGHY, P.L.; GRUPP, J.L.; GRUPP, G.; BALWIERCZAK, J.L.; WILLIAMS, J.S. y SCHWARTZ, A. (1984a). Correlation of nitrendipine and BAY K8644 binding to isolated canine heart sarcolemma with their pharmacological effects on the canine heart. *Eur. J. Pharmacol.* 102: 373-374.
- VAGHY, P.L.; GRUPP, J.L. y SCHWARTZ, A. (1984b). Effects of BAY K 8644 a dihydropyridine analog on [ $^3$ H]nitrendipine binding to canine cardiac sarcolemma and the relationship to a positive inotropic effect. *Circ. Res.* 55: 549-553.
- VAN BREEMEN, C.; AARONSON, P.; LOUTZENHISER, R. y MEISHERI, K.D. (1980). The biology of calcium ions in the myocardial cell. En: GODFRAIND, A.; ALBERTINI, A. y PAOLETTI, R. (eds.) *Calcium modulators*, Amsterdam, Elsevier Biomedical Press, pp.5-16.
- VAN DER KERKHOFF, W. y DREWES, L.R. (1989). Transporte de nimodipino y nifedipino a través de la barrera hematoencefálica y su distribución regional *in vivo*. *Rev. Clin. Esp.* 185(Suppl. 1): 62-65.

- VAN HARTEM, J.; VAN BRUMMELEN, P.; WILSON, J.H.P y BREIMER, D.D. (1987). Pharmacokinetics and haemodynamics effects of nisoldipine in patients with liver cirrhosis. En: HUGENHOLTZ, P.G. y MEYER, J. (eds.) *Nisoldipine 1987*, Berlin, Springer-Verlag, pp. 76-79.
- VANHOUTTE, P.M. (1987). The expert committee of the World Health Organization on classification of calcium antagonists: The view point of the rapporteur. *Am. J. Cardiol.* 59: 3A-8A.
- VANHOUTTE, P.M. y PAOLETTI, R. (1987). The WHO classification of calcium antagonists. *Trends Pharmacol. Sci.* 8: 4-5.
- VAN NUETEN, J.M. y LAL, H. (1974). Naloxone-induced facilitation of contractions spontaneous activity and tolerance to morphine in ileum of morphine-dependent guinea-pigs. *Arch. int. Pharmacodyn. Ther.* 208: 378-382.
- VAN NUETEN, J.M.; VAN REE, J.M. y VANHOUTE, P.M. (1977). Inhibition by met-enkephalin of peristaltic activity in the guinea pig ileum, and its reversal by naloxone. *Eur. J. Pharmacol.* 41: 341-342.
- VAN ZWIETEN, P.A. (1985). Calcium antagonists-terminology, classification and comparison. *Arzneim. Forsch.* 35: 298-309.
- VARGAS, M.L.; MUSACCHIO, J.M.; BANSINATH, M.; TURNDORF, H. y PUIG, M.M. (1987). Naloxone elicits an excitatory response in the morphine tolerant mouse vas deferens. *Neuropharmacology* 26: 1815-1818.
- VAZQUEZ, B.J.; OVERSTREET, D.H. y RUSSEL, R. W. (1974). Psychopharmacological evidence for increase in receptor sensitivity following chronic morphine treatment. *Psychopharmacologia* 38: 287-302.
- VETULANI, J. y BEDNARCZYK, B. (1977). Depression by clonidine of shaking behavior elicited by nalorphine in morphine-dependent rats. *J. Pharm. Pharmacol.* 29: 567-569.
- VICENTINI, L.M.; MILLER, R.J. y ROBERTSON, M.J. (1983). Chronic opiate treatment does not modify alpha-2 adrenergic receptors in rat cerebral cortex, kidney and in neuromotor cell line NCB20. *Eur. J. Pharmacol.* 95: 265.
- VINAYEK, R.; BROWN, D.R. y MILLER, R.J. (1985). Tolerance and cross-tolerance to the antisecretory effects of enkephalins on the guinea-pig ileal mucosa. *J. Pharmacol.*

*Exp. Ther.* 232: 781-785.

- VOGT, M. (1954). The concentrations of sympathin in different parts of the central nervous system under normal conditions and after the administration of drugs. *J. Physiol.* 123: 451-481.
- WAGNER, J.A.; REYNOLDS, I.J. y SNYDER, S.A. (1987). Physiological and pharmacological correlates of calcium antagonist receptors. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 10: S1-S9.
- WANG, F.S. y TSOU, K. (1989). Substance P and leucine-enkephalin release in guinea pig ileum during naloxone-precipitated morphine withdrawal. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 249: 329-332.
- WANG, X.J.; WANG, J.F. y HAN, J.S. (1990). Effects of dynorphin A and CCK-8 on synaptosomal <sup>45</sup>Ca uptake of the rat spinal cord. *Shen Li Hsueh Pao* 42: 226-232.
- WARD, A. y TAKEMORI, A.E. (1976a). Studies on the narcotic receptor in the guinea pig-ileum. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199: 117-123.
- WARD, A. y TAKEMORI, A.E. (1976b). Effect of 6-hidroxydopamine and 5,6-dihydroxytryptamine on the response of the coaxially stimulated guinea pig ileum to morphine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 199: 124-130.
- WARD, S.J.; LOPRESTI, D. y JAMES, D.W. (1986). Activity of *mu*- and *delta*-selective opioid agonists in the guinea pig ileum preparation: differentiation into peptide and nonpeptide clases with beta funaltrexamine. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 238: 625-631.
- WASHTON, A.M. y RESNICK, R.B. (1980). Clonidine for opiate detoxification: outpatient clinical trial. *Am. J. Psychiatry* 137: 1121-1122.
- WATERFIELD, A.A.; SMOKCUM, R.W.J.; HUGHES, J.; KOSTERLITZ, H.W. y HENDERSON, G. (1977). *In vitro* pharmacology of the opioid peptides, enkephalins and endorphins. *Eur. J. Pharmacol.* 43: 107-116.
- WAUQUIER, A. (1982). Brain protective properties of etomidate and flunnarizine. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2(Suppl. I): 553-556.
- WAY, E.L. (1981). *Postulated role of calcium in opiate action*. Proc. Int'l. Neuropharmacology, Taipei pp: 147-154.



- WAY, E.L.; LOH, H.H. y SHEN, F.H. (1968). Morphine tolerance, physical dependence and synthesis of brain 5-hydroxytryptamine. *Science* 162: 1290-1292.
- WAY, E.L.; LOH, H.H. y SHEN, F.H. (1969). Simultaneous quantitative assesment of morphine tolerance and physical dependence. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 167: 1-8.
- WERNER, U.; STARKE, K. y SCHUMANN, H.J. (1972). Actions of clonidine and 2-(2-methyl-6-cyclohexylamino)-2-oxazoline on postganglionic autonomic nerves. *Arch. int. Pharcadonyn. Ther.* 195: 282-290.
- WERZ, M.A. y MACDONALD, R.L. (1985). Dynorphin and neoendorphin peptides decrease dorsal root ganglium neuron calcium-dependent action potential duration. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 234: 49-56.
- WIBO, M.; DOUNG, A.T. y GODFRAIND, T. (1980). Subcellular location of semicarbazide-sensitive amine oxidase in rat aorta. *Eur.J. Biochem.* 112: 87-94.
- WILKENING, D. y NIRENBERG, M. (1980). Lipid requirement for long-lives morphine-dependent activations of adenylate cyclase of neuroblastoma x glioma hybrid cells. *J. Neurochem.* 34: 321-326.
- WILLIAMS, J.T. y NORTH, R.A. (1984). Opiate-receptor interaction on single *locus coeruleus* neurones. *Mol. Pharmacol.* 26: 489-497.
- WILLIAMS, R.J.P. (1970). The biochemistry of sodium, potassium, magnesium and calcium. *Q. Rev. Lond. Chem. Soc.* 24: 331-365.
- WORLEY, P.F., BARABAN, J.M. y SNYDER, S.H. (1987). Beyond receptors: multiple second-messenger systems in brain. *Ann. Nerurol.* 21: 217-229.
- WÜSTER, M.; COSTA, T. y GRAMSCH, CH. (1983). Uncoupling of receptors is essential for opiate induced desensitization (tolerance) in neuroblastoma x glioma hybrid cells NG108-15. *Life Sci.* 33: 341-344.
- WÜSTER, M.; SCHULZ, R. y HERZ, A. (1979). Selectivity of opioids towards the  $\mu$ -,  $\delta$ - and  $\sigma$  opiate receptors. *Neurosci Lett.* 15: 193-197.
- WUYTACK, F.; LANDON, E.; FLEISCHER, S. y HARDMAN, T.J. (1978). The calcium accumulation in a microsomal fraction from porcine coronary artery smooth muscle. A study of the heterogeneity of the fraction. *Biochem. Biophys. Acta.* 540: 253-269.

- XIANG, J.-Z.; BRAMMER, M.J. y CAMPBELL, I.C. (1990). Studies of receptor-mediated inhibition of  $^{45}\text{Ca}$  accumulation into synaptosomes. *Br. J. Pharmacol.* 101: 140-144.
- YAARY, Y.; HAMON, B. y LUX, H.D. (1987). Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons. *Science* 235: 680-682.
- YANO, I. y TAKEMORI, A.E. (1977). Inhibition by naloxone of tolerance and dependence in mice treated acutely and chronically with morphine. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 16: 721-732.
- YAMAMOTO, H.; HARRIS, R.A.; LOH, H.H. y WAY, E.L. (1978). Effects of acute and chronic morphine treatments on calcium localization and binding in brain. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 205: 255-264.
- YOSHIMURA, K.; HUIDOBRO-TORO, J.P. y WAY, E.L. (1982). Potency of three opiate antagonists to reverse the inhibitory activity of dynorphin, enkephalin and opioid-like alkaloids on the guinea-pig ileum. *Eur. J. Pharmacol.* 84: 17-24.
- YOSHIMURA, K. y NORTH, R.A. (1983). Substantia gelatinosa neurones hyperpolarized *in vitro* by enkephalin. *Nature* 305: 529-530.
- YOUNG, W.S.III; BIRD, S.J. y KUCHAR, M.J. (1977). Ionophoresis of methionine-enkephalin in the *locus coeruleus* area. *Brain Res.* 129: 366-370.
- YU, V. y SADEE, W. (1988). Efficacy and tolerance of narcotic analgesics at the *mu* opioid receptor in differentiated human neuroblastoma cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 245: 350-355.
- ZHANG, L.J.; WANG, X.J.; HAN, J.S. (1990). Phorbol ester suppression of opioid analgesia in rats. *Life Sci.* 47: 1775-1782.
- ZIEGLGÄNSBERGER, W.; FRENCH, E.D.; MERCURY, N.; PELAYO, F. y WILLIAMS, J.T. (1982). Multiple opiate receptors on neurons of the mammalian central nervous system: *in vivo* and *in vitro* studies. *Life Sci.* 31: 2343-2346.
- ZIEGLGÄNSBERGER, W. y FRY, J.P. (1976). Actions of enkephalin on cortical and striatal neurones of naive and morphine-dependent rats. En: KOSTERLITZ, H.W. (ed.) *Opiates and Endogenous Opioid Peptides*, Amsterdam, Elsevier, pp. 231-238.

- ZIGUN, J.R.; BANNON, M.J. y ROTH, R.H. (1981). Comparison of two alpha-noradrenergic agonists (clonidine and guanfacine) on norepinephrine turnover in the cortex of rats during morphine abstinence. *Eur. J. Pharmacol.* 70: 565-570.
- ZUKIN, R.S.; EGHBALI, M.; OLIVE, D.; UNTERWALD, E.M. y TEMPEL, A. (1988). Characterization and visualization of rat and guinea pig brain  $\kappa$  opioid receptors: evidence for  $\kappa_1$  and  $\kappa_2$  opioid receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4061-4065.
- ZUKIN, S.R. y ZUKIN, R.S. (1979). Specific [ $^3$ H]-phencyclidine binding in rat central nervous system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76: 5372-5376.